

## ARTICULO ORIGINAL

**Respuesta de proliferación linfocitaria con mitógeno en pacientes con herpes labial****Lymphocyte proliferation response with mitogen in patients with herpes labialis****\*Picaguá E, Cabello A**

Dpto. de Inmunología Celular. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Asunción-Paraguay

**RESUMEN**

Numerosas investigaciones se han focalizado sobre la respuesta inmune celular con el objeto de definir la causa de las frecuentes recurrencias de la infección por herpes simple. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta proliferativa de los linfocitos a mitógeno PHA-M en pacientes con herpes labial recurrente. Fueron estudiados 15 pacientes adultos, de ambos sexos y 14 individuos adultos sin historia de herpes labial. Se utilizó sangre periférica de los pacientes, obtenida en forma estéril con heparina. Las células mononucleares fueron separadas sobre gradiente de Ficoll-Hypaque y para estudiar la proliferación celular ( $2,5 \times 10^6$  células/ml) fueron cultivadas en medio RPMI 10% de FBS, en triplicado a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) por 72 horas. La proliferación celular se midió utilizando un método colorimétrico MTT [3-(4,5 dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. Como controles se utilizaron células mononucleares no estimuladas con PHA. En los 15 pacientes estudiados, se observó una buena respuesta proliferativa con PHA-M, incluso el índice de estimulación fue superior a 1, sin embargo comparando con los individuos sin historia de herpes labial, el índice de estimulación estuvo disminuido siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,003$ ). Solo un paciente que en el momento del estudio presentó herpes labial tenía disminuido el índice de proliferación, por lo que probablemente la proliferación de linfocitos disminuye en el momento de la crisis. Estudios futuros en donde se evaluarán la proliferación específica con el virus del herpes nos permitiría determinar si existe un defecto en la inmunidad celular secundaria a la infección.

**Palabras claves:** Herpes labial, proliferación celular, PHA-M.**ABSTRACT**

Several research studies have focused on the cellular immune response in order to define the causes of the frequent recurrences of herpes simplex virus infection. The objective of this study was to evaluate the proliferative response of lymphocytes to PHA-M mitogen in patients with recurrent herpes labialis. Fifteen male and female adult patients and 14 adults without any records of herpes labialis were studied. Peripheral blood was sterilely obtained from all subjects using heparin anticoagulant. The mononuclear cells were separated on a Ficoll-Hypaque gradient and to study the cellular proliferation,  $2.5 \times 10^6$  cells/ml were cultured in triplicate in RPMI medium with 10% FBS at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  stimulated with phytohemagglutinin (PHA) for 72 hours. The cellular proliferation was measured using a colorimetric assay with MTT [3-(4.5 dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyl tetrazoliumbromide]. Non-stimulated mononuclear cells were used as controls. The 15 patients studied showed good proliferative response with PHA-M and a stimulation index higher than 1 but the index was decreased comparing with the patients without records of herpes labialis being the difference between the two groups statistically significant ( $p < 0.003$ ). Only one patient with herpes labialis at the time of the study had a decreased proliferation index which could probably mean that the lymphocyte proliferation decrease in the crisis moment. Future studies that evaluate the specific proliferation with the herpes virus would allow us to determine if there is a defect in the cellular immunity secondary to the infection.

**Keywords:** Herpes labialis, cellular proliferation, PHA-M.

---

\* Autor correspondiente: Dra. Estela Picaguá  
Dpto. Inmunología Celular-Inst. Inves. Ciencias de la Salud  
Río de la Plata y Lagerenza. CC: 2511. Asunción-Paraguay  
E-mail: [icelular@iics.una.py](mailto:icelular@iics.una.py)

## INTRODUCCIÓN

La infección recurrente por el virus del herpes simple (VHS) es un problema común que afecta a un porcentaje importante de la población, provocando un impacto social importante, ya que las diversas terapias antivirales conocidas tienen resultados controversiales<sup>1-5</sup>.

El herpes labial es una enfermedad causada por la infección del área bucal con el virus del herpes simple, muy a menudo el tipo 1 (VHS 1), que se caracteriza por la erupción de ampollas pequeñas y dolorosas, ubicadas por lo general en la piel de los labios, mucosa oral, encías o en la zona peribucal. El paciente puede tener fiebre, pérdida del apetito y un malestar general<sup>1-9</sup>. Típicamente, la infección primaria es más severa que las repeticiones, y la diseminación viral es mayor en el episodio inicial, aunque la cantidad de virus diseminado parece no estar relacionado con la severidad de la agresión<sup>1, 7, 10, 11</sup>.

Después de un primer contacto con el virus, normalmente en la infancia, este permanece "dormido" o en estado de latencia en el ganglio nervioso sin producir daño y presenta en diversas ocasiones reactivaciones desencadenadas. Se conocen un gran número de factores ambientales y psicosociales que pueden desencadenar un brote de herpes labial (estrés emocional, exposición solar, procesos febriles, traumatismos, fatiga, menstruación, manipulaciones dentales), sin que se conozcan hasta el momento los mecanismos exactos por lo que dichos factores reactivan el virus<sup>7, 9, 11, 13</sup>.

La mayoría de las recurrencias son secundarias a la reactivación endógena del virus y no a una reinfección exógena y se produce a pesar de la presencia de anticuerpos antivirales circulantes. Después de su ingreso en la piel, el VHS se replica localmente en el interior de las células epiteliales parabasales e intermedias, lo que da como resultado la lisis de las células infectadas y la inducción de una respuesta inflamatoria local. La infección afecta los linfáticos y los ganglios linfáticos regionales que drenan el sitio de infección primaria. La replicación ulterior de los virus puede conducir a una viremia con diseminación visceral, lo que dependerá del estado inmunológico del huésped<sup>11-13</sup>.

La depresión de la respuesta inmune celular estaría relacionada con una infección más severa por VHS. Con el objeto de definir las bases de las frecuentes recurrencias, muchas investigaciones se han focalizado en la evaluación de la respuesta inmune celulo-mediata. Estudios de blastogénesis linfocitaria han demostrado reactividad dentro de las 4 a 6

semanas después del inicio de la infección. Con las recurrencias, se promueven respuestas proliferativas rápidamente, pero estas respuestas después de la infección primaria, decrecen con el tiempo<sup>14</sup>.

El objetivo del presente estudio fue conocer la respuesta proliferativa con mitógeno (PHA-M) de los linfocitos de pacientes con infecciones de herpes labial recurrentes por el VHS 1, para evaluar la inmunidad celular.

## MATERIALES Y METODOS

**Pacientes:** Fueron estudiados 15 pacientes, adultos, de ambos sexos con el diagnóstico de herpes labial recurrente, de los cuales en el momento del estudio solamente 1 paciente se encontraba con episodio de herpes labial y ninguno con tratamiento con inmunosupresores y 14 individuos aparentemente sanos que refirieron no haber presentado infecciones herpéticas recurrentes. Todos fueron estudiados con el consentimiento previo de los pacientes.

**Obtención de células mononucleares:** Se utilizó sangre periférica obtenida en forma estéril con heparina. Las células mononucleares fueron separadas sobre gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma, USA).

**Estudio de la proliferación celular:** Las células mononucleares 200  $\mu$ l ( $2,5 \times 10^6$  células/ml) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (GIBCO, USA) con 10% de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO, USA), en triplicado a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, estimuladas con fitohemaglutinina-M (PHA-M) (Sigma, USA) en triplicado por 72 horas. Como controles se utilizaron células mononucleares no estimuladas con PHA-M.

La proliferación celular se midió utilizando un método colorimétrico MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma, USA).

## RESULTADOS

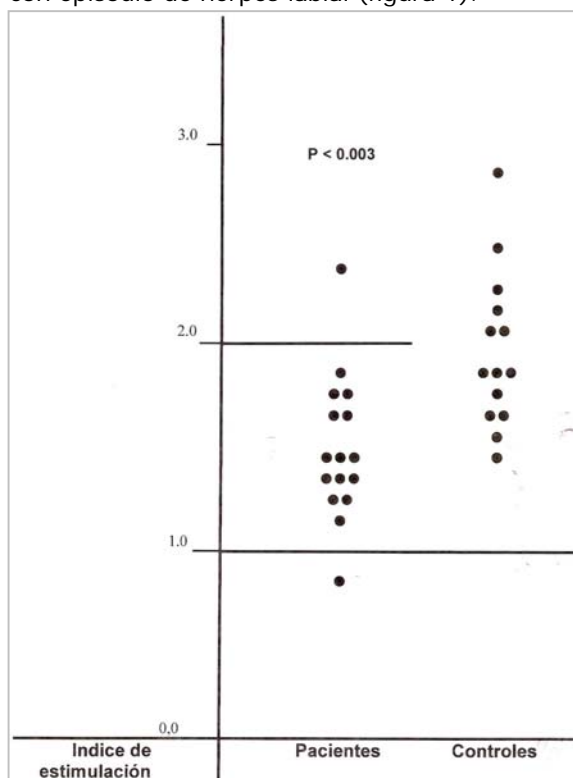
Del total de pacientes estudiados 12 (80%) fueron del sexo femenino y 3 (20%) del sexo masculino. De los controles 2(14%) fueron del sexo masculino y 12(86%) del sexo femenino. La edad media de los pacientes con herpes recurrente labial fue de  $32,93 \pm 7,27$  años y de los individuos aparentemente sanos fue de  $31,50 \pm 7,20$  años.

Tanto en los pacientes estudiados, como en los individuos que refirieron no tener infecciones herpéticas recurrentes se observó una buena respuesta proliferativa con PHA-M ( $1,52 \pm 0,34$  versus  $2,22 \pm 0,47$ ,  $p < 0,003$ ).

Sin embargo, comparando el índice de estimulación (IE), si bien los pacientes

presentaron superior a 1, considerado normal, se encontró disminuido con relación a los individuos que refirieron no tener infecciones herpéticas recurrentes que presentaron un IE superior a 2, siendo estadísticamente significativa.

Un solo paciente presentó un IE inferior a 1, pero en el momento del estudio se encontraba con episodio de herpes labial (figura 1).



**Figura 1.** Proliferación de linfocitos en pacientes con herpes labial recurrente.

## DISCUSION

En este estudio, aún cuando se encontró una buena respuesta proliferativa en los pacientes estudiados, esta respuesta estuvo disminuida comparando con los individuos sin historia de herpes labial. Solo un paciente que en el momento del estudio presentó herpes labial tenía disminuido el índice de proliferación, por lo que probablemente la proliferación de linfocitos disminuye en el momento de la crisis. En este contexto algunos autores han encontrado que los desórdenes de la inmunidad mediada por células a menudo ocurren durante las recurrencias y que el número de células T y sus funciones se encuentran disminuidos en el momento de la crisis<sup>12,13</sup>.

Algunos autores indican que la madurez de los macrófagos en el sitio de la infección local ayuda a determinar si el virus permanece

localizado o se disemina y posteriormente se desencadena otros mecanismos de defensa del huésped, tales como la producción de interferones, células killer naturales, anticuerpos protectores y linfocitos killer sensibilizados para evitar la diseminación de la infección<sup>11</sup>.

Estudios futuros permitirán evaluar si existe un defecto en la inmunidad celular secundaria a la infección o solo relacionado con la crisis y factores que puedan intervenir en estas alteraciones.

En este grupo de pacientes estudiados indicaría la importancia de estudiar la funcionalidad de otras poblaciones celulares como la natural killer, para determinar a que nivel se encuentra un defecto inmunológico secundario a la infección por el herpes simple.

## BIBLIOGRAFIA

1. Raborn GW, Grace MGA. Recurrent herpes simplex labialis: Selected therapeutic options. *J Can Dent Assoc* 2003; 69 (8): 498-503.
2. Leung DT, Sacks SL. Docosanol: a topical antiviral for herpes labialis. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5 (12): 2567-71.
3. Spruance SL, Stewart JCB, Rowe NH, McKeough MB, Wenerstrom G, Freeman DJ. Treatment of Recurrent Herpes Simplex Labialis with Oral Acyclovir. *J Infect Dis* 1990; 161:185-90.
4. Spruance SL, Stewart JCB, Freeman DJ, Brightman VJ, Jack L.Cox, Wenerstrom G, et al. Early Application of Topical 15% Idoxuridine in Dimethyl Sulfoxide Shortens the Course of herpes Simplex Labialis: a Multicenter Placebo- Controlled Trial. *J Infect Dis* 1990; 161:191-7.
5. Arduino PG, Porter SR. Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: review of its management. *Oral Dis* 2006; 12 (3):254-70.
6. Birek C, Ficarra G. The diagnosis and management of oral herpes simplex infection. *Curr Infect Dis Rep* 2006; 8 (3):181-8.
7. Janeway CA, Travers P. Failures of Host Defense Mechanisms. In *Immunobiology of the immune system in health and disease*. 2nd ed. London: Current Biology, Garland Publishing, Churchill Livingstone; 1996. (Pt.10):4-5.
8. Kolokotronis A, Dumas S. Herpes simplex virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic gingivostomatitis. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (3): 202-11.
9. Stoopler ET. Oral Herpetic infections (HSV 1-8). *Dent Clin North Am* 2005; 49 (1):15-29.
10. Da Silva LM, Guimaraes AL, Victoria JM, Gómez CC, Gómez RS. Herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity of seropositive patients. *Oral Dis* 2005; 11 (1):13-6.
11. Hirsch MS. Virus herpes simple. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, directores. *Enfermedades infecciosas: Principios y Práctica*. 4nd ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1997. p.1495-503.

12. Simon HU, Roth H, Forner K, Haroske D. Immunological status of patients with recurrent herpes simplex infections. *Allerg Immunol Leipz* 1990; 36 (2): 111-8.

13. Whitley RJ. Herpes simplex viruses. En: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press; 1990. p. 1843-74.

14. Vestey JP, Norval M, Howie SE. Lymphoproliferative responses in recrudescing orofacial herpetic infections. *J R Soc Med* 1990; 83 (5): 308-11.