



11219 7
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGUPO SOCIAL
HOSPITAL DE INFECTOLOGIA
CENTRO MEDICO NACIONAL 'LA RAZA'

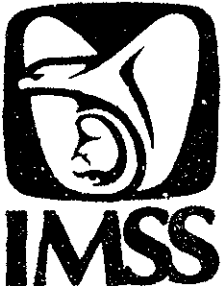
IL-8, TNF- α y TGF- β COMO PREDICTORES DE
CARGA VIRAL DETECTABLE A LAS DOS SEMANAS
DE TRATAMIENTO CON IFN- α + RIBAVIRINA EN
PACIENTES CON HEPATITIS CRONICA POR
VIRUS C
(ESTUDIOPRELIMINAR)

T E S I S
QUE PARA OBTENER LA SUBESPECIALIDAD EN
I N F E C T O L O G I A
P R E S E N T A :
DR JOSE CARLOS TECALERO HERNANDEZ

L

ASESORES:
DRA GLORIA MARIA CALDERON RODRIGUEZ
DR ROGELIO NAVARRETE CASTRO

COLABORADORES:
DRA KATYA MAGAÑA MUÑOZ
M EN C MARIA DE LA LUZ MARTINEZ R.



MEXICO, D F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

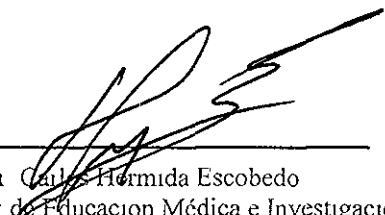


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso


DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).


El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.




Dr. Carlos Hermida Escobedo
Coordinador de Educación Médica e Investigación



Dra. Elena Urdez Hernández
Titular del curso Universitario



Dra. Gloria María Calderón Rodríguez
Asesor Área Básica



Dr. Rogelio Navarrete Castro
Asesor Área Clínica



Dr. José Carlos Tecalero Hernández
Tesisista



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M.

*A ti, esposa y
compañera mía, que haces más
amable y fácil
mi andar*

*A ustedes
Padres
que han determinado
gran parte de
mi,
y con ello,
mi forma de avanzar
por este camino*

IL-8, INF- α y IGF- β COMO PREDICTORES DE CARGA VIRAL DETECTABLE A LAS DOS SEMANAS DE TRATAMIENTO CON IFN- α + RIBAVIRINA EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C (ESTUDIO PRELIMINAR)

INTRODUCCIÓN:

Después del desarrollo de pruebas diagnósticas para la hepatitis A y B en los años 70 s, se sospechó de un tercer agente causal de hepatitis viral, al que se le denominó hepatitis no-A no-B, y que resultó responsable de la mayoría de los casos transmitidos por transfusión, posteriormente se le llamó Virus de la Hepatitis C (VHC), el cual adquirió una gran importancia epidemiológica (1) Este virus es el principal agente causal de cirrosis alrededor del mundo, se ha estimado que cerca de 170 millones de personas se encuentran infectadas en forma crónica por este virus En Estados Unidos de Norteamérica (EUA) una encuesta epidemiológica de 1988 hasta 1994 en 21241 personas mayores de 6 años determinó una prevalencia de 1.8% en estos sujetos, es decir, 3.1 millones de personas en todo el país con infección por este virus con 2.7 millones con infección crónica (2)

En nuestro país la prevalencia difiere de acuerdo al tipo de población y lugar estudiados Méndez y colaboradores, reportan en población del banco de sangre de Medica Sur una prevalencia de 0.47% (3), Hernández y colaboradores en el hospital Militar el 0.74% (8), mientras que en el IMSS de Durango del 1.47% y en el Instituto Nacional de la Nutrición y Ciencias Médicas en pacientes del servicio de urgencias la prevalencia fue del 7.8% e IC 95% 6.2-9.8 (4) La Dirección General de Epidemiología reporta en el año de 2000 un total de 678 casos, y hasta la semana 34 del año 2001, 382 casos acumulados (www.epi.org.mx/boletin)

El virus de la hepatitis C se clasifica en el género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*, su genoma es RNA de cadena sencilla en sentido positivo, aproximadamente de 9600 nucleótidos, codifica una poliproteína mediante un solo segmento de lectura (ORF, por las siglas en inglés de open reading frame) que es proteolíticamente separado en 10 diferentes productos, las proteínas estructurales (C, E1 y E2) y las no estructurales (NS2, NS3A, NS3B, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) De las primeras, la proteína C es el mayor componente de la nucleocapside, la E2 interacciona con el CD81 para permitir la unión del virus con la célula blanco e inhibe la PK-activada por RNA que es a su vez inducida por el interferón (IFN) con lo que evita la inhibición de síntesis de proteínas secundaria al tratamiento con IFN; la E1 parece contribuir a la fusión de la membrana del virus y por lo tanto a la entrada del mismo (17) Las proteínas no estructurales son requeridas para la replicación del RNA viral, la NS2/NS3 funciona como proteínasa que separa de ella misma a la NS3, funcionando esta última en el lado amino-terminal como proteínasa encargada de separar el resto de las NS, mientras que en el carboxi-terminal como NTP-asa/helicasa esencial para la translación y replicación del genoma Sin embargo, esta NS3 tiene otras funciones importantes, por ejemplo, interfiere con funciones celulares al inhibir señales de transducción o transformación celular mediadas por la proteína-quinasa-A (18) Mutaciones en el gen que codifican a la proteína NS5A se relacionan con resistencia al tratamiento de IFN α en virus del genotipo 1b (6), bloqueando el sitio catalítico de la PKR La NS5B es una RNA polimerasa dependiente de RNA(5)

La calidad de la respuesta inmune parece ser crucial en la eliminación o no de la infección, además, se ha demostrado que el VHC no es citopático, por lo que la persistencia

del virus en el hígado estimula continuamente la respuesta de los linfocitos T (11), este proceso por lo tanto puede ser el mecanismo principal de daño en la infección crónica; por ello, el conocimiento de la respuesta inmunológica es determinante (7,9)

En lo que respecta a la inmunidad humoral, a pesar de que hay una alta producción de anticuerpos neutralizantes que podrían detener la entrada de este virus a la célula blanco, existe un alto porcentaje de evolución hacia la cronicidad esto podría deberse a que estos anticuerpos no son tan efectivos ya que existe una rápida producción de mutaciones en los epítomos reconocidos por éstos, evitando así, el reconocimiento de las nuevas variantes (11) Se ha demostrado que la RNA polimerasa dependiente de RNA y su alto índice de error es la causa de esta gran variabilidad; se ha estimado la frecuencia de sustituciones de los nucleótidos en forma espontánea es de hasta 1000 sustituciones por nucleótido por año. Por lo anterior, dentro de un determinado individuo infectado por VHC, la población viral consiste de una mezcla heterogénea de viriones estrechamente relacionados, los cuales varían entre sí de 1-9% de bases, al producto de esta variabilidad se le denominan cuasiespecies (12) Las consecuencias biológicas de la presencia de estas son evasión de la respuesta inmune celular y humoral, tropismo celular variable (linfotrópico o hepatotrópico), falla de la vacunación y rápido desarrollo de resistencia a los fármacos

La respuesta de los LT CD4+, no es del todo clara, por ejemplo en pacientes con infección crónica se ha encontrado que está dirigida a un estrecho número de antígenos del VHC y es inversamente proporcional al título de anticuerpos contra el virus (7); otro estudio al investigar la respuesta de estas células, no encontró respuesta, probablemente por utilizar solo antígenos del genotipo 1a, el cual no representaba la cepa circulante en esa población (9)

Al igual que en otro tipo de infecciones virales, los linfocitos T CD4+ parecen tener un papel determinante, dependiendo de la polarización de su respuesta hacia T tipo 1 o tipo 2 (Th1 o Th2), caracterizadas por el patrón de citocinas que producen. En la respuesta tipo Th1 se producen Interleucina (IL)-1, IL-2, IL-12, IFN- γ y TNF- α las cuales son estímulos importantes para la respuesta inmune celular, que incluye a los linfocitos T citotóxicos y las células Natural Killer (NK). El perfil de la respuesta de tipo Th2 se compone principalmente de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 las cuales favorecen la inmunidad humoral con la producción de anticuerpos por las células B. Es importante señalar que ambas son mutuamente excluyentes y que al parecer una inhibe a la otra (10)

Pacientes con infección aguda por VHC quienes aclaran el virus y tienen un cuadro de hepatitis aguda autolimitada desarrollan una fuerte respuesta de tipo Th1 con proliferación de LT al ser estimulados con antígenos del core (7), mientras que los pacientes que presentan una infección crónica, muestran un tipo de respuesta Th2 predominando una mayor actividad de Linfocitos B con producción de anticuerpos (7,14) Las observaciones anteriores sugieren que los efectos de las citocinas del patrón Th1 son cruciales en la protección contra el VHC, mientras que las de tipo Th2 pueden favorecer la persistencia del patógeno (10)

Cribier y cols (15) cuantificaron los niveles de IL-2, su receptor soluble (IL-2Rs), IFN- γ , TNF α , IL-4, IL-6 e IL-10 mediante ELISA en el suero de 134 pacientes VHC positivos, 69 de los cuales presentaron coinfección con VIH, y 54 VIH-VHC fueron negativos. El nivel medio de IL-2Rs e IFN- γ fueron mucho mayores en pacientes con VHC positivos, comparados con los controles, mientras que los niveles de IL-4 e IL-6 fueron más bajos. No se presentaron diferencias en los pacientes con y sin VIH. Aún cuando los niveles

de citocinas deben ser interpretados con precaución, los resultados de este estudio sugieren que la respuesta Th1 esta incrementada en la infección por VHC Kawakami y colaboradores (16) estudiaron 89 sujetos con infección por VHC (41 hombres y 48 mujeres, edad promedio de 62 años), con diversos grados de la enfermedad (22 portadores asintomático con ALTs normales durante un seguimiento de 10 años a pesar de carga viral detectable, 56 con infección crónica y 11 con cirrosis hepática), comparados con 24 sujetos sanos, en todos los casos se realizaron estudios de citometría de flujo a células mononucleares de sangre periférica para cuantificar las células positivas a IL-4 e IFN- γ demostrándose que el mayor porcentaje se observó en los portadores de VHC, en los pacientes con infección crónica y en los que presentaban cirrosis hepática comparados con los sujetos sanos ($p < 0.01$, respectivamente) Resultados semejante se observaron al determinar IL-2Rs ($p < 0.001$) al compararse a los individuos infectados en diferentes estadios de la enfermedad con los sujetos sanos Este estudio demuestra que a diferencia de trabajos anteriores, los autores sugieren que las citocinas Th1 están relacionadas en la patogénesis del daño hepático causado por la infección por VHC

El tratamiento recomendado de la infección crónica por virus de la Hepatitis C, esta basado en las recomendaciones hechas por The National Institutes of Health (NIH) en 1997, donde establece que el régimen debe consistir en IFN- α 2b (3 millones UI tres veces por semana mas ribavirina 1000-1200 mg día por lo menos durante un año (42) La acción del interferón esta basada en lo siguiente: a) activa la endorribonucleasa, la cual degrada el RNAm del virus e inhibe la síntesis de proteínas, bloqueando la producción de nuevos viriones, b) bloquea la transcripción del RNA viral y c) activa las células asesinas naturales Por otro lado, la ribavirina es un análogo de nucleosidos que inhibe la replicación *in vitro* de virus RNA y DNA al prevenir la síntesis de nucleótido de guanosina y la RNA polimerasa (27,28,29,30) Se sugiere que el efecto benéfico de la ribavirina en combinación con INF-2 α en el tratamiento de la infección crónica por VHC, puede ser mediada por modulación del sistema inmune y no por su efecto antiviral directo (31) En LT activados con fitohemaglutinina y en presencia de ribavirina *in vitro*, se incrementan los niveles de IL-2, IL-4, INF- γ y TNF- α Esto se confirma en ratones inmunizados con HBeAg y HBcAg que recibieron ribavirina, con niveles 25 veces más altos de IL-2 e INF- γ comparados con los no tratados(32) En ratones transgénicos HBeAg (HBeAg-Tg) tratados con ribavirina, se provocó supresión dosis-dependiente en la producción de anticuerpos dirigidos contra el antígeno, mediado por una respuesta Th2, indicando un cambio en el balance de la respuesta Th1/Th2 (33)

En un modelo de hepatitis en ratones producido por el virus de hepatitis murina-3 (VHM-3) (34), tratados con Ribavirina se demostró una disminución en la severidad de la infección con disminución en la producción de mediadores proinflamatorios, tales como el TNF alfa e IL-1 Ning et al (35) encontraron que la ribavirina inhibe en forma dosis-dependiente la replicación viral del VHM-3, previene la producción de TNF- α e IL-1 β por los MF, lo contrario al IFN- γ (incluso a nivel de RNAm) Lo anterior se corrobora en ratones (BALB/cJ, C3H/HcJ y A/J) Los autores sugirieron que la ribavirina es un potente inhibidor de las citocinas proinflamatorias producidas por la infección viral, y que el beneficio en el tratamiento clínico parecen estar relacionado con la disminución de la activación de los macrófagos y disminución en la producción de citocinas Th2, mientras que preserva las tipo Th1 El efecto del fármaco en el RNAm de células T humanas activadas (36) se caracteriza por incremento en IL-2 e INF- γ , en ambos tipos de células T,

CD4+ y CD8+, y se sugiere que en el modelo utilizado la ribavirina promueve la respuesta de tipo Th1: Otro grupo estudió el efecto del IFN- α sobre la expresión de RNAm en leucocitos de sangre periférica de pacientes crónicamente infectados por el VHC (37), antes y después del tratamiento. El RNAm de citocinas tipo Th2 se incrementó con el tratamiento utilizado, pero la inducción de estas citocinas no se relacionó con reducción de la viremia. En cuanto a las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α , se incrementaron posterior al tratamiento en forma significativa, principalmente la segunda.

El Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF- β , por sus siglas en inglés, Transforming Growth Factor), es una citocina que se puede producir mediante la intervención de TNF α e IL-1 (39), puede además inducir proliferación y cambio en el patrón de proteínas secretadas al medio (matriz) de los fibroblastos, probablemente en forma autocrina o parácrina. Por otro lado se ha demostrado que uno de los genes inducidos durante la activación de células esteladas del hígado o "células almacenadoras de lípidos" (que son las responsables del exceso de síntesis de matriz extracelular durante la fibrosis del hígado) fue precisamente el que codifica al receptor del TGF- β (40). Por lo que se supone debe tener un papel importante en la fibrosis muy probablemente compartiendo esta importancia con TNF α (41).

El TNF- α está relacionado con la severidad de la infección por VHC, e incluso se ha demostrado que puede predecir respuesta sostenida a la monoterapia con IFN- α 2b (44), en este estudio se midieron los niveles de IL-6, IL-8, IL-12, TGF- β e TNF- α de 18 sujetos con infección por VHC, en el análisis multivariado se demuestra que niveles bajos de TNF- α y niveles altos de IL-8 se asocian en forma independiente a respuesta sostenida a la terapia. El TNF- α correlaciona fuertemente con los niveles de viremia y genotipo como predictores ($p < 0.001$) y el TGF- β se relaciona con el grado de fibrosis. Un estudio posterior del mismo autor (38), caracteriza los niveles de IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α en pacientes con infección crónica por VHC sin cirrosis y los compara con pacientes portadores de enfermedad hepática por alcohol (EHA) y sujetos sanos. Sus resultados muestran que IL-6 y TNF- α antes del tratamiento están elevadas en forma significativa con respecto a los sujetos sanos, aún cuando el TNF- α es menor que en los sujetos con EHA. Al evaluar la cinética de estas citocinas, se observa que en los pacientes con respuesta sostenida el TNF- α tiene un nivel más bajo al inicio el cual disminuye aun más con el tratamiento y se mantiene bajo durante el seguimiento, a diferencia de los pacientes con recaída en los que estos niveles se elevan al término del tratamiento. En los no respondedores los niveles son mayores antes del tratamiento y no disminuyen incluso durante el seguimiento, con un comportamiento muy diferente al de los que sí respondieron ($p < 0.05$).

Existen otros factores relacionados con la respuesta al tratamiento, incluyendo el genotipo (el 1b se relaciona con mala respuesta), los altos niveles de viremia al inicio del tratamiento, el daño histológico inicial, edad (19), sexo (20), estado de inmunosupresión (21-22), y el consumo de alcohol (23-24) entre otros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPOTESIS:

Existe relación entre los niveles elevados de IL-8 TNF- α y TGF- β con la detección de carga viral a las dos semanas de tratamiento con Interferon + ribavirina en pacientes con infección crónica por Virus C

OBJETIVOS:

Objetivo general: evaluar si existe asociación entre los niveles séricos de la IL-8, INF α y TGF- β con los niveles de carga viral a las dos semanas de terapia con Interferón α -2b y ribavirina en individuos infectados por el Virus de la Hepatitis C manejados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza

Objetivos específicos:

- a) Evaluar los niveles pre-tratamiento de IL-8, TNF- α y TGF- β en plasma de individuos infectados por el Virus de la Hepatitis C manejados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza
- b) Medir el grado de asociación entre los niveles de IL-8, TNF- α y TGF- β con la detección de carga viral a las dos semanas de tratamiento a base de Interferón y ribavirina en individuos infectados por el Virus de la Hepatitis C manejados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza

HIPOTESIS:

Existe relación entre los niveles elevados de IL-8 TNF- α y TGF- β con la detección de carga viral a las dos semanas de tratamiento con Interferon + ribavirina en pacientes con infección crónica por Virus C

OBJETIVOS:

Objetivo general: evaluar si existe asociación entre los niveles séricos de la IL-8, INF α y TGF- β con los niveles de carga viral a las dos semanas de terapia con Interferón α -2b y ribavirina en individuos infectados por el Virus de la Hepatitis C manejados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza

Objetivos específicos:

- a) Evaluar los niveles pre-tratamiento de IL-8, TNF- α y TGF- β en plasma de individuos infectados por el Virus de la Hepatitis C manejados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza
- b) Medir el grado de asociación entre los niveles de IL-8, TNF- α y TGF- β con la detección de carga viral a las dos semanas de tratamiento a base de Interferón y ribavirina en individuos infectados por el Virus de la Hepatitis C manejados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza

DISEÑO:

Estudio trasversal comparativo

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- a) individuos a los cuales se les haya demostrado adecuadamente infección por el Virus de la Hepatitis C mediante resultados positivos de ELISA y confirmados con RIBA para VHC, carga viral positiva, hallazgos histopatológicos compatibles con infección crónica y elevación (o nov) de transaminasas hepáticas (ALT y AST), que sean manejados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza
- b) Pacientes de ambos sexos
- c) Mayores de 16 años y menores de 65 años
- d) Enfermedad hepática compensada producida por Virus de la Hepatitis C, con los siguientes requisitos:
- e) que firmen la hoja de consentimiento informado

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN:

- a) Individuos con otra infección viral, además de Virus de la Hepatitis C, por ejemplo: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Hepatitis B (VHB), Virus de la Hepatitis D (VHD)
- b) Pacientes a los que se les administró tratamiento con medicamentos inmunomoduladores, hormonales o antivirales en los 6 meses previos al inicio del estudio
- c) Pacientes con hepatitis alcohólica, autoinmune, o por otras etiologías como enfermedades metabólicas como hemocromatosis, medicamentos, neoplasias, o infección por otros gérmenes
- d) Pacientes adictos a drogas o con alcoholismo
- e) Pacientes portadores de enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoide, troiditis autoinmune, etc
- f) Pacientes con enfermedad renal grave o terminal
- g) Pacientes con Hepatitis por Virus C grave o con complicaciones tardías
- h) Pacientes con Infección por el Virus de la Hepatitis C embarazadas

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- a) Pacientes que soliciten ser excluidos del estudio
- b) Pacientes que suspendan temporalmente (un mes) o definitivamente el tratamiento sin indicación médica
- c) Pacientes con efectos adversos graves al medicamento

DISEÑO:

Estudio trasversal comparativo

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- a) individuos a los cuales se les haya demostrado adecuadamente infección por el Virus de la Hepatitis C mediante resultados positivos de ELISA y confirmados con RIBA para VHC, carga viral positiva, hallazgos histopatológicos compatibles con infección crónica y elevación (o nov) de transaminasas hepáticas (ALT y AST), que sean manejados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza
- b) Pacientes de ambos sexos
- c) Mayores de 16 años y menores de 65 años
- d) Enfermedad hepática compensada producida por Virus de la Hepatitis C, con los siguientes requisitos:
- e) que firmen la hoja de consentimiento informado

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN:

- a) Individuos con otra infección viral, además de Virus de la Hepatitis C, por ejemplo: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Hepatitis B (VHB), Virus de la Hepatitis D (VHD)
- b) Pacientes a los que se les administró tratamiento con medicamentos inmunomoduladores, hormonales o antivirales en los 6 meses previos al inicio del estudio
- c) Pacientes con hepatitis alcohólica, autoinmune, o por otras etiologías como enfermedades metabólicas como hemocromatosis, medicamentos, neoplasias, o infección por otros gérmenes
- d) Pacientes adictos a drogas o con alcoholismo
- e) Pacientes portadores de enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoide, troiditis autoinmune, etc
- f) Pacientes con enfermedad renal grave o terminal
- g) Pacientes con Hepatitis por Virus C grave o con complicaciones tardías
- h) Pacientes con Infección por el Virus de la Hepatitis C embarazadas

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- a) Pacientes que soliciten ser excluidos del estudio
- b) Pacientes que suspendan temporalmente (un mes) o definitivamente el tratamiento sin indicación médica
- c) Pacientes con efectos adversos graves al medicamento

MATERIAL Y MÉTODO:

DISEÑO: estudio transversal comparativo

Pacientes se incluyeron al estudio sujetos en los que se probó adecuadamente infección crónica por Virus de la Hepatitis C, manejados en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) perteneciente a la Delegación N°2 del Distrito Federal. Se registró fecha de diagnóstico, nivel de transaminasas en sangre, carga y genotipo viral.

Biopsia hepática mediante la técnica por punción ya establecida se tomó muestra de tejido hepático suficiente y adecuado para estudio histopatológico y determinar el índice de Knodell.

Pruebas bioquímicas se realizaron determinaciones de transaminasas hepáticas (ALT y AST), biometría hemática y química sanguínea.

Carga viral se determinó mediante AMPLICOR (Roche Molecular System) antes de iniciar el tratamiento (basal) y a las 2 semanas del tratamiento.

Genotipo viral se determinó mediante el ensayo de Inno-Lipa HCV (Innogenetics, Belgium) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Determinación del nivel de citocinas se tomó muestra de sangre periférica de los pacientes se obtuvo plasma, el cual se congeló (-70°C) hasta su uso, para la determinación de los niveles de IL-8, TNF- α y IGF- β mediante ELISA (Immunoassay Kit Cytoscreen US Biosource International, Camarillo, CA, USA) como se ha descrito previamente (38).

Seguimiento clínico se realizó una evaluación subsecuente con resultados de laboratorio a las 2 semanas.

Asociación entre niveles de citocinas y carga viral a las dos semanas de tratamiento

Una vez tomada la carga viral a las dos semanas, se clasificó a los pacientes según la carga viral presentada, como pacientes con carga viral no detectable y con carga viral detectable. De esta manera se realizó la comparación entre los dos grupos para identificar si existió relación entre los niveles de IL-8, TNF α y IGF- β con la carga viral.

Análisis estadístico

La información se codificó a números. Posteriormente se utilizó el programa estadístico de Nanostat para analizar por frecuencia simple y medidas de tendencia central.

El análisis para determinar la asociación entre detección de carga viral y nivel de citocinas fue mediante OR IC 95%. Así mismo se evaluó la presencia de distractores epidemiológicos mediante análisis secuencial con OR no sesgado, en busca de factores modificadores con análisis simultáneo.

Las pruebas no paramétricas que se utilizarán: Mantel-Hanszel, Fisher y χ^2 de heterogeneidad para evaluar la confianza de las diferencias entre grupos como edad, género, genotipo, nivel de daño histológico y de transaminasas.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS:

Se incluyeron 18 pacientes, 8 mujeres (44%) y 10 hombres (56%) Edad promedio de 45 años (rango de 18 a 62 años), de los cuales 5 presentaron carga viral indetectable (casos) a las dos semanas y 13 carga viral detectable (controles) En las características generales de estos pacientes encontramos como datos sobresalientes, el que los pacientes que presentaron carga viral no detectable tenían un promedio de 38 años (rango 18-62), índice de Knodell promedio de 5 (rango 2-9) y ninguno presento fibrosis comparados con los pacientes que presentaron carga viral detectable, los cuales presentaron edad promedio de 47 años (rango 27-62), Knodell de 6 (rango 2-12) y el 31% de ellos presento fibrosis en su biopsia hepática (Tabla 1)

TABLA 1 CARACTERISTICAS GENERALES

CARGA VIRAL	<1000	>1000
Edad	38 (18-62)	47 (27-62)
Hombres	3 (60%)	7 (54%)
Mujeres	2 (40%)	6 (46%)
Knodell	5 (2-9)	6 (2-12)
Fibrosis	Ninguno	Sin fibrosis 9 (69%) Con fibrosis 4 (31%)
Genotipo	1b 1 (20%) 2 a 4 (80%)	1 a 3 (22.5%) 1 b 7 (53.5%) 2 a 1 (7.5%) 2 b 2 (15%)
Otro genotipo	2c 2 (40%)	2c 1 (7.5%)
Carga Viral copias/ml	821400(107000->1millón)	793,225 (323730->1millón)
TGO UI	48.6 (29-111)	74.6 (24-252)
TGP UI	91.8 (44-244)	66.3 (24-220)
IL-8 (pg/ml)	47.4 (43-53)	48 (48-58)
TNF- α (pg/ml)	311.2 (217-603)	230 (189-283)
TGF- β (ng/ml)	7952 (156-23400)	5552 (323-15600)

Al hacer el análisis bivariado encontramos que el TNF- α no tiene asociación con la detección de carga viral a las dos semanas después del tratamiento OR= 0.60 (IC95% 7.8-0.04), mientras que el TGF- β y la IL-8 si la tienen, mostrando OR= 1.75 (IC95% 0.2-15.03) y OR=2.5 (IC95% 0.29-12.6) respectivamente (Tabla 2)

La asociación más fuerte se presentó entre los niveles de IL-8 antes del tratamiento y la detección de carga viral a las dos semanas, aun cuando los niveles de TGF- β también presentaron asociación importante. Posteriormente se realizó un análisis sistemático para detectar el punto de corte con mayor asociación, encontrando que, para la IL-8 este punto fue 50 pg/ml, mientras que para el TGF- β fue 3 ng/ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 2 ANÁLISIS BIVARIADO.

Citocina	OR	IC95%
TNF- α (>200 pg/ml)	0.60	7.8-0.04
TGF- β (>3 ng/ml)	1.75	0.20-15.03
IL-8 (>50 pg/ml)	2.5.	0.29-12.6

Después de determinar el punto de corte más adecuado, se realizó un análisis secuencial para determinar la presencia de distractores epidemiológicos, tomando por separado, como contraste principal, las asociaciones de TGF- β e IL-8 mostradas en la tabla anterior. La asociación encontrada entre TGF- β (>3 ng/ml) y la carga viral detectable (>1000 cp/ml) a las dos semanas de tratamiento se mantiene consistente con las siguientes variables: género, Knodell, genotipo, ALI y TNF- α . Pero se sobrestima con la edad y se subestima con los niveles de IL-8 (Tabla 3).

TABLA 3 Evaluación de distractores epidemiológicos y la consistencia de TGF- β > 3 ng/ml como factor relacionado a la detección de carga viral después de 2 semanas de tratamiento combinado en pacientes infectados por VHC.

Contraste principal

TGF- β > 3 ng/ml vs TGF- β < 3 ng/ml OR 1.75 IC95% 0.20-15.03

Distractores	OR no sesgado	IC 95%
Género	1.69	0.17-16.6
Edad	0.66	13.4-0.03
Knodell	1.58	57.6-0.03
Genotipo	1.45	0.12-16.0
Coinfección	1.30	0.13-12.0
AST	1.50	0.24-9.10
ALI	1.50	0.30-7.30
TNF	1.58	0.02-9.49
IL-8	2.33	0.16-33.7

Con lo que respecta a la relación entre IL-8 >50 pg/ml con la presencia de carga viral a las dos semanas de tratamiento se mantiene consistente con todas los distractores epidemiológicos estudiados, excepto con la edad donde se subestima y la carga viral con la que se sobrestima (TABLA 4).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 4 Evaluación de distractores epidemiológicos y la consistencia de IL-8 > 50 pg/ml como factor relacionado a la detección de carga viral después de dos semanas de tratamiento combinado en pacientes infectados por VHC.

Contraste principal:

IL-8 > 50 pg/ml vs. IL-8 < 50 pg/ml OR 2.5 IC95% 0.29-12.6

Variables	OR no sesgado	IC 95%
Género	2.75	0.18-40.8
Edad	7.9	0.26-237
Knodell	2.05	0.25-16.7
Genotipo	2.7	0.12-59.3
Co-infección	2.14	0.19-23.7
Carga Viral	1.60	0.12-20.2
AST	2.5	0.19-32.5
ALP	1.65	0.18-14.6
TNF	2.14	0.19-23.7

Se sometieron a análisis simultáneo a aquellos factores que demostraron predicción en conjunto con los niveles de IGF- β e IL-8. Esto demostró que en ciertos subgrupos el comportamiento es diferente, con mayor fuerza de predicción. En pacientes con índice de Knodell > 7 los niveles de IGF- β > 3 ng/ml, mostraron 2 veces mayor posibilidad de presentar carga viral detectable a las dos semanas de tratamiento (OR 2.0 IC95% 0.03-122.7), comparado con aquello que presentaron Knodell < 7 en los cuales los niveles de IGF- β pierden su asociación. La misma observación se presentó en aquellos pacientes con genotipo 1 OR 1.25 (IC95% 0.04-36).

Así mismo, en pacientes menores de 40 años con niveles de IL-8 > 50 pg/ml, se observó que tienen 6 veces más posibilidad de presentar carga viral detectable a las dos semanas de tratamiento OR 6 (IC95% 0.17-201), comparado con pacientes mayores de 40 años, donde la asociación se pierde OR 0.28 (IC95% 7.46-0.01). Lo mismo sucede en pacientes con Knodell < 7 OR 2.4 (IC95% 0.15-36.5) y genotipos 2 a-b OR 1.5 (IC95% 0.04-55.5).

Al analizar en forma simultánea ambas citocinas que mostraron asociación en el análisis bivariado, encontramos que niveles de IGF- β > 3 ng/ml solo predicen una carga viral detectable cuando la IL-8 es menor de 50 pg/ml, es decir que la IL-8 es la que tiene mayor fuerza de asociación (Tabla 5).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 5. Análisis simultaneo

Factor predictor	OR	IC95%	p
IGF- β > 3 ng/ml	1.75	0.20-15.03	NS
Factor que modifica la predicción:			
Knodell <7	0.8	10.4-0.06	NS
Knodell >7	2.0	0.03-122.7	NS
Genotipo 1 a-b	1.25	0.04-36	NS
Genotipo 2 a-b	0.40	14.9-0.01	NS
IL-8 <50 pg/ml	1.66	0.12-21.0	NS
IL-8 >50 pg/ml	0.57	13.1-0.008	NS
Factor predictor:			
IL-8 > 50 pg/ml	2.5	0.29-12.6	NS
Factor que modifica la predicción:			
Knodell <7	2.4	0.15-36.5	NS
Knodell >7	0.5	30.6-0.08	NS
Genotipo 2 a-b	1.50	0.04-55.5	NS
Genotipo 1 a-b	0.50	240-0.001	NS
Edad <40 años	6.0	0.17-201	NS
Edad >40 años	0.28	7.46-0.01	NS
Hombres	1.5	0.07-31.8	NS
Mujeres	0.5	3.58-0.06	NS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión:

Estudios previos han reportado que el TNF- α tiene importancia como predictor de respuesta sostenida en pacientes tratados con interferon- α en monoterapia o en terapia combinada con ribavirina (38, 44), contrario a lo que encontramos en nuestro estudio; sin embargo, en nuestro reporte el desenlace es la detección de carga viral a las dos semanas de tratamiento combinado, diferente al punto final de los estudios previos, en los que la evaluación fue al finalizar el seguimiento tomando en cuenta criterios bioquímicos, virológicos e histopatológicos con los que se definió respuesta al tratamiento. Otro factor importante es que la población estudiada es diferente, ya que nuestro estudio es una cohorte, homogénea, que recibe tratamiento combinado, mientras que en los estudios previos (38, 44) se incluyeron pacientes con monoterapia, con fracaso y otros pacientes sin tratamiento. Otro punto diferente que consideramos importante, es que se controló en el análisis simultáneo otras variables que son conocidas como predictoras de respuesta (edad, género, carga viral, niveles de ALT e índice de Knodell). Sin embargo, debemos confirmar los hallazgos de este reporte preliminar en la cohorte total, para descartar o apoyar la importancia del TNF- α en esta infección, ya que como se ha demostrado en estudios *in vitro* y en animales, uno de los efectos de la ribavirina es la de inmunomodular la respuesta hacia la producción de citocinas Th1, dentro de las cuales se encuentra el TNF- α (30-32,35-36).

En los resultados presentados aquí, los niveles del Factor de Crecimiento Transformante-beta (IGF- β) se asociaron en una forma más débil a la posibilidad de presentar carga viral detectable a las dos semanas OR 1.75 (IC95% 0.20-15.03), e incluso la asociación se modificó al controlarla con la edad, la carga viral y el índice de Knodell, observando que el IGF- β se podría considerar como un mejor predictor en los pacientes con índice de Knodell mayor de 7 comparado con los que tienen Knodell <7, lo que coincide con la literatura previa, ya que esta citocina se ha asociado principalmente al daño histológico (40-41), así entonces, podemos considerarla en forma indirecta como un factor que influye en la respuesta al tratamiento, ya que está bien establecido que un índice de Knodell alto se asocia a mala respuesta. Existen estudios previos donde se evalúa la asociación de esta citocina y el daño hepático, encontrando que la disminución en los niveles plasmáticos de IGF- β después del tratamiento se asocian con regresión de la fibrosis encontrada, en ambos respondedores y no respondedores (49), incluso en un modelo animal se demostró que el receptor soluble de IGF- β tipo II, disminuye la formación de fibrosis hepática (50).

Es también importante señalar que el valor predictor de IGF- β >3 ng/ml se pierde al ser analizado en forma simultánea con IL-8 >50 pg/ml, lo que nos demuestra que la citocina más importante en cuanto a predecir carga viral detectable a las dos semanas, es precisamente la IL-8.

La IL-8 es una proteína quimiotáctica, perteneciente a la familia CXC de las quimocinas a la cual se le han atribuido efectos sobre la replicación viral en algunas infecciones, entre las que se encuentran CMV (43) y el virus de la polio (45). Además, en modelos *in vitro* la IL-8 inhibe los efectos antivirales del Interferon- α (46), e incluso se demostró que la NS5A incrementa la transcripción del RNA de esta interleucina (47), lo que podría explicar los hallazgos de nuestro estudio, en el que observamos una asociación entre los niveles altos de IL-8 y la presencia de carga viral detectable después de dos semanas de tratamiento con Interferon- α y ribavirina. Solo conocemos un reporte previo

donde se estudió la relación de los niveles de IL-8 con la respuesta al tratamiento (48), sin embargo, solo se busco la asociación con la respuesta bioquímica al final del tratamiento demostrando mayores niveles de la interleucina en los pacientes no respondedores, pero no se reportan los niveles de carga viral antes ni después del tratamiento. Si tomamos en cuenta que existen artículos donde se demuestra que los niveles indetectables de carga viral a las dos semanas de tratamiento combinado son predictores de respuesta a largo plazo, podemos suponer que los niveles de IL-8 > 50 pg/ml se asocian con falla terapéutica a largo plazo, ya que en nuestro estudio los pacientes que presentaron estos niveles de IL-8, tienen 2.5 veces más probabilidad de tener carga viral detectable a las dos semanas de tratamiento aún después de controlar el resto de las variables conocidas como predictoras de respuesta en un análisis simultáneo, sin embargo, la significancia estadística es pobre, lo que puede ser explicado por la pequeña muestra estudiada hasta este momento.

Conclusiones:

Debemos confirmar los resultados en los pacientes del estudio completo. Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento podemos sugerir que los niveles de IL-8 > 50 pg/ml predicen la posibilidad de presentar carga viral a las dos semanas de tratamiento, principalmente en pacientes menores de 40 años, en pacientes con un índice de Knodell menor de 7 y en pacientes hombres. Los niveles de IGF- β > 3ng/ml predicen la detección de carga viral a las dos semanas de tratamiento en pacientes con un índice de Knodell >7, en pacientes infectados con genotipos 1 y en pacientes con niveles de IL-8 < 50pg/dl.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

donde se estudió la relación de los niveles de IL-8 con la respuesta al tratamiento (48), sin embargo, solo se busco la asociación con la respuesta bioquímica al final del tratamiento demostrando mayores niveles de la interleucina en los pacientes no respondedores, pero no se reportan los niveles de carga viral antes ni después del tratamiento. Si tomamos en cuenta que existen artículos donde se demuestra que los niveles indetectables de carga viral a las dos semanas de tratamiento combinado son predictores de respuesta a largo plazo, podemos suponer que los niveles de IL-8 > 50 pg/ml se asocian con falla terapéutica a largo plazo, ya que en nuestro estudio los pacientes que presentaron estos niveles de IL-8, tienen 2.5 veces más probabilidad de tener carga viral detectable a las dos semanas de tratamiento aún después de controlar el resto de las variables conocidas como predictoras de respuesta en un análisis simultáneo, sin embargo, la significancia estadística es pobre, lo que puede ser explicado por la pequeña muestra estudiada hasta este momento.

Conclusiones:

Debemos confirmar los resultados en los pacientes del estudio completo. Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento podemos sugerir que los niveles de IL-8 > 50 pg/ml predicen la posibilidad de presentar carga viral a las dos semanas de tratamiento, principalmente en pacientes menores de 40 años, en pacientes con un índice de Knodell menor de 7 y en pacientes hombres. Los niveles de IGF- β > 3ng/ml predicen la detección de carga viral a las dos semanas de tratamiento en pacientes con un índice de Knodell >7, en pacientes infectados con genotipos 1 y en pacientes con niveles de IL-8 < 50pg/dl.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- 1 - Clarke B **Molecular Virology of hepatitis C virus** J Gen Virol 1997; 78: 2397-2410
- 2 - Alter M, Kruszon-Moran D, Nainan O, McQuillan G, Gao F, et al **The Prevalence of Hepatitis C Virus in The United States 1998 Through 1994** N Engl J Med 1999, 341: 556-62
- 3 - Méndez S, Baptista GH, Sánchez GRH, Bordes AJ, Uribe EM **Prevalencia de Hepatitis B y C en donadores de sangre en un Hospital de Tercer nivel de la Ciudad de México** Salud Pub Mex 1999; 41: 475-78
- 4 - Kato M, Ponce de León S, Sifuentes O, Sigfrido R, Calva MJ, et al **Bloodborne viral infections in patients attending an Emergency Room in México City** Infection Control and Hospital Epidemiology 2000, 21: 600-2
- 5 - Bartenschlager R and Lohmann V **Replication of hepatitis C virus** J Gen Virol 2000, 81: 1631-48
- 6 - Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami I, et al **Mutations in the Nonstructural Protein 5^a Gene and Response to Interferon in Patients with Chronic Hepatitis C Virus 1b Infection** N Engl J Med 1996; 334:77-81
- 7 - Lechmann M, Georg H, Braunschweiger I, Giers G, Jung G, et al **T and B-cell Responses to Different Hepatitis C Virus Antigens in Patients With Chronic Hepatitis C Infection and in Healthy Anti-Hepatitis C Virus-Positive Blood Donors Without Viremia** Hepatology 1996, 24: 790-95
- 8 - Hernández P, Frías S y Del Ángel G **Seroprevalencia de anticuerpos contra el virus de la Hepatitis C en donadores de sangre del Hospital Central Militar.** Salud Pub Mex 1994, 36: 538-40
- 9 - Not known **Hepatitis C Virus-specific T lymphocyte responses** Current Op Immunol 1995; 7: 532-38
- 10 - Jacobson B and Neuman M **Immunopathogenesis of C viral infection: Th1/Th2 responses and role of cytokines.** Clin Biochem 2000; 34:167-71
- 11 - Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A, Alter HJ, Purcell RH, et al **Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and emergence of neutralization escape mutant viruses.** J Virol 1994; 68: 1494-500
- 12 - Zein N **Clinical Significance of Hepatitis C virus genotypes.** Clin Microbiol Rev 2000; 13: 223-35
- 13 - referencia suprimida
- 14 - Minutello MA, Pileri P, Unutmaz D, Censini S, Kuo G, et al **Compartmentalization of T-lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4⁺ T-cell specific for protein NS4 of hepatitis C virus in patients with hepatitis C infection** J Exp Med 1993, 178: 17-25
- 15 - Cribier B, Schmitt C, Rey D, Lang JM, et al **Production of Cytokines in Patients infected by Hepatitis C Virus.** J Med Virol 1998 Jun; 55 (2): 89-91 (Abstract)
- 16 - Kawakami Y, Nabeshima S, Furusyo N, Sawayama Y, Hayashi J, et al **Increased Frequency of Interferon- γ -Producing Peripheral Blood CD4⁺ T Cells in Chronic Hepatitis C Virus Infection** Am J Gastroenterol 2000; 95: 227-32



- 17 - Yasui K , Wakita I , Tsukiyama K., Funahashi S , Ichicawa M , et al **The Native form and maturation process of hepatitis C Virus core protein** J Virol 1998, 72:6048-55
- 18 - Kolykhalov A , Mihalik K , Feinstone S and Rice C **Hepatitis C Virus-Encoded Enzymatic Activities and Conserved RNA Elements in the 3' Nontranslated Region Are Essential for Virus Replication In Vivo.** J Virol 2000; 74 2046-51
- 19 - Tong MJ, El-Farra NS , Reijes AR and Co RL **Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C.** N Engl J Med 1995, 332: 1463-6
- 20 - Kenny-Wlash E **Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin** Irish Hepatology Research Group. N Engl J Med 1999, 340. 1228-33
- 21 - Charlton M , Seaberg E , Wiesner R , Everhart J , Zetterman R , et al **Predictors of patients and graft survival following liver transplantation for hepatitis C** Hepatology 1998; 28: 823-30
- 22 - Feray C , Caccamo L , Alexander G , Ducot B , Gugenheim J. et al **European collaborative study on factors influencing outcomes after liver transplantation for hepatitis C.** Gastroenterology 1999, 117 619-25
- 23 - OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC GROUPS **Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C** Lancet 1997; 349:825-32
- 24 - Pressione F , Degos F , Marcellin P , Njapoum C , Martinot-Pignoux M , et al **Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C.** Hepatology 1998, 27 1717-22
- 27 - Hosoya M , Shigeta S , Ishi T , Suzuki H and Clerecq E **Comparative inhibitory effects of various nucleoside and non-nucleoside analoges on replication of influenza virus types A and B *in vitro* and *in ovo*** JID 1993; 168: 641-6
- 28 - Spanish Ribavirin Trial Group **Comparison of ribavirin and placebo in CDC group III human immunodeficiency Virus infection.** Lancet 1991; 338: 6-9
- 29 - Jiang Z , Cunimoto M and Patel J **Autocrine regulation and experimental modulation of interleukin-6 expression by human pulmonary epithelial cells infected with Respiratory Syncytial Virus** J Virology 1998; 72: 2496-99
- 30 - Dusheiko G , Main J , Thomas H , Richard O , Lee C , et al **Rivabirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study** J Hepatology 1996; 25: 591-98
- 31 - Richard O , Norkrans G , Fryden A , Braconir H , Sonnerborg A , et al **Randomised double-blind placebo controlled trial of interferon alpha2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C.** Lancet 1998, 351 83-87
- 32 - Hultgren C , Milich D , Weiland O and Sallderg M **The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance hepatitis B and C virus-specific immune responses.** J Gen Virol 1998; 79: 2381-91
- 33 - Hultgren C , Milich D , Weiland O and Sallderg M **Rivabirin therapy shift the T helper Th1/Th2 subset balance *in vivo*** Gastroenterol Clin Biol 1997, 21: A92 (Abstract)
- 34 - Sidwell R , Huffman L , and Allen I **Effect of ribavirin on viral hepatitis in laboratory animals.** Ann NY Acad Sci 1977:284: 239-48 (Abstract)
- 35 - Ning Q , Brownd D , Parodo J , Cattral M , Gorszynski R. et al **Ribavirin inhibit viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fg12 prothrombinase and preserves Th1 Cytokine Production But inhibits Th2 Cytokine Response** J Immunol 1998, 160: 3487-93

- 36 - Tam R, Pai B, Baird J, Lim C, Averett D, et al **Ribavirin polarizes Human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile** J Hepatology 1999; 30: 376-82
- 37 - Shapiro S, Gershtein V, Elias N, Zuckerman E, Salzman N, et al **mRNA cytokine profile in peripheral blood cells from chronic hepatitis C virus (HCV)-infected patients: effects of interferon-alpha treatment** Clin Exp Immunol 1998; 114: 55-60
- 38 - Neuman M, Benhamout JP, Malkiewicz I, Akremi R, Shear N, et al **Cytokines as predictors for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with chronic hepatitis C**. Clin Biochem 2001; 34: 173-82
- 39 - Rodemann P, Binder A, Burger A, Güven N, Löffler H, et al **The underlying cellular mechanism of fibrosis**. Kidney Int 1996; 49 suppl 54, S32-36
- 40 - Brenner D, Waterboer T, Choi S, Lindquist J, Stefanovic B, et al **New aspects of hepatic fibrosis**. J Hepatology 2000; 32 (suppl 1): 32-38
- 41 - Kinnman N, Anderson U and Hulterantz R **In situ expression of IGF-beta-3, latent IGF-beta binding protein and INF-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C** Scand J Gastroenterol 2000; 35: 1294-300
- 42 - NIH CONFERENCE **Patogenesis, Natural History, treatment and prevention of Hepatitis C** Ann Intern Med 2000; 132: 296-305
- 43 - Murayama T, Kumo K, Jisaki M, Obuchi D, Sakamuro T et al **Enhancement of human cytomegalovirus replication in a human lung fibroblast cell line by interleukin-8** J Virol 1994; 68: 7582-85
- 44 - Neuman M, Benhamout JP, Malkiewicz I, Akremi R, Shear N, et al **Predictors of Sustained Response to Alpha interferon Therapy in Chronic Hepatitis C** Clin Biochem 1999; 32: 537-45
- 45 - Khabar, K, Al-Zoghaibi T, Murayama K, Matsushima N, Mukaida Y, et al **Interleukin-8 selectively enhances cytopathic effect (CPE) induced by positive-strand RNA virus in the human WISH cell line** Biochem Biophys Res Commun 1997; 235: 774-8 (Abstract)
- 46 - Kabbar K, Al-Zoghaibi F, Al-Ahdal M, Murayama T, Dhalla M, et al **The α Chemokine, interleukin 8, Inhibits the antiviral Action of Interferon α** J Exp Med 1997; 186: 1077-85
- 47 - Plyak S, Khabar K, Paschal D, Ezelle H, Duverlie G, et al **Hepatitis C Virus Nonstructural 3 protein Induces Interleukin-8, Leading to Partial Inhibition of the Interferon-Induced Antiviral Response**. J Virol 2001; 75: 6095-6106
- 48 - Plyak S, Khabar K, Rezeiq M and Gretch D **Elevated Level of Interleukin-8 in Serum Are Associated with Hepatitis C Virus Infection and Resistance to Interferon Therapy** J Virol 2001; 75: 6209-11
- 49 - Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, et al **Reduced plasma transforming growth factor- β I levels in patients with chronic hepatitis C after interferon- α therapy: association with regression of hepatic fibrosis** J Hepatol 1999; 30: 1-7
- 50 - George J, Roulot D, Kotlirsky V and Bissell M **In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor- β type II receptor: potential new therapy for hepatic fibrosis**. Proc Natl Acad Sci 1999; 96: 12719-24

