

COMPARACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE  
INTERLEUCINA 15 (IL-15), ÓXIDO NÍTRICO (NO) E  
INSULINA EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA  
POR VIRUS DE HEPATITIS C (VHC)

**DR. RAÚL CONTRERAS OMAÑA**

ESPECIALIDAD: **GASTROENTEROLOGÍA**

ASESOR DE TESIS:

**Dra. Ma. Antonieta Xóchitl García Samper**

CO-ASESOR DE TESIS:

**Dr. Luis Felipe Montaña Estrada**

Número de Registro: **0044/09**

Año: **2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Antonieta Xóchitl García Samper, por haberme brindado su amistad, su cariño, su confianza y sus conocimientos durante estos fugaces tres años.

Al Dr. Luis Felipe Montaña Estrada y a todo el equipo del laboratorio de Inmunobiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por el invaluable respaldo brindado para que esta tesis pudiera ver la luz.

A Sheila, por ser el pilar de mi vida.

A mis Maestros:

Dr. Israel Podolsky Rapaport

Dr. Rafael Trejo Estrada

Dr. Menahem Shueke Esses

Dr. Sergio Cañedo Chávez

Dra. Marina González Martínez

Por recibirme siempre con los brazos abiertos, y por haberme permitido aprender de ellos que la medicina era mucho más de lo que yo esperaba, y que la Gastroenterología es un mundo en el que vale la pena vivir.

A mis padres; sin su apoyo y sabiduría nada de esto habría sucedido.

A mis hermanos Bere, Shary y Jorge, quienes estoy cierto disfrutarán de este logro tanto como yo.

A mi amigo de toda la vida, Dr. Roberto Bernardo Escudero, y a su esposa Angélica, por el tiempo y paciencia dedicados al análisis estadístico de este estudio.

A mis mejores amigos: Pablo, Mario, Ivonne, Leo, Eliel, Sandra, Luigi, Elvira, Marvin, Xóchitl, Luis, Beatriz, Jack y Pilar. Sé que nos vemos poco, pero siempre los llevo en el corazón.

A la ciencia.

Y tal vez debería agradecer a Dios. Pero Él y yo tenemos un pacto difícil de explicar.

## DEDICATORIAS

*A Sheila.*

*A mis Padres y Amigos.*

*A la Vida.*

*Y a lo que habrá de venir después.*

## RESUMEN

En el presente estudio se analizaron muestras de 55 pacientes de ambos sexos con diagnóstico de infección crónica por virus de Hepatitis C (VHC), con el fin de cuantificar los niveles de Interleucina 15 (IL-15), óxido nítrico (NO) e insulina, tres moléculas que es sabido desempeñan una importante función en la regulación de diversas respuestas inmunes y en el mantenimiento de la reacción inflamatoria.

Una vez obtenidos dichos resultados, se procedió a compararlos entre sí, con el fin de determinar la existencia o no de relación entre los valores de cada uno de los elementos estudiados. Esto para buscar establecer posibles nuevas interacciones fisiopatológicas que permitan entender el comportamiento de la enfermedad.

Como resultado se obtuvo que en la mayor parte de los pacientes estudiados los niveles de IL-15 se encuentran disminuidos o nulos, mostrando relación significativa en el análisis bivariado con los niveles séricos de NO ( $p=0.003$ ) mediante aplicación de la prueba "T" de Student. Por el contrario, los niveles de insulina se encontraron dentro de rangos normales en casi todas las muestras, y éstos no mostraron relacionarse con ninguna de las otras dos moléculas estudiadas.

Con lo anterior se llegó a la conclusión de que en la mayor parte de los pacientes con infección crónica por VHC analizados en este estudio los niveles indetectables de IL-15 pueden explicar en parte la evolución del virus a cronicidad, y por otro lado, aunque los niveles séricos de insulina no mostraron relación con la IL-15, los niveles de NO sí van de la mano con la detección o no detección de esta citocina, lo que tal vez sugiere la presencia de un nexo fisiopatológico entre la producción de ambas moléculas, aunque se requiere de mayores estudios para establecer con más firmeza esta asociación.

## ABSTRACT

The present study analyzed blood samples from 55 chronic HCV infected patients from both genders, with the aim of measuring serum levels of IL-15, Nitric Oxide and insulin, three molecules which are known to influence in a very important way the regulatory, immune and inflammatory pathways in the liver.

Once measurements were obtained, we proceeded to compare them with each other, searching to detect the presence or absence of a relationship between values. Our goal was to establish new possible physiopathologic interactions that may lead to a better understanding of the disease.

As a result we obtained the following data: in most of the studied patients, the IL-15 levels were importantly diminished or absent, showing a significant relationship with the Nitric Oxide levels ( $p=0.003$ ) in the bi-variate analysis. On the contrary, serum insulin levels were always found between normal values in almost all samples, and they didn't showed a significant relationship with any of the other two molecules neither.

Considering all the previous data, we reached the conclusion that in the majority of patients chronically infected with HCV analyzed in this study, the almost undetectable levels of IL-15 may in part explain the viral evolution to chronicity, and on the other way, regardless that the normality of the serum insuline levels didn't showed a correlation with IL-15 values, the Nitric Oxide levels did showed a significant relationship with the presence or absence of this cytokine. This may suggest the presence of a significant physiopathological nexus between production and manifestation of both molecules, although more studies to precisely stablish this association are still needed.

## ÍNDICE

PORTADA EXTERNA .....	I
PORTADA INTERNA .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
DEDICATORIA .....	IV
ÍNDICE .....	V
RESUMEN .....	VI
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO .....	2
A. VIRUS DE LA HEPATITIS (VHC): GENERALIDADES .....	2
B. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VHC .....	28
C. ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS INDUCIDAS POR VHC .....	42
III. DEFINICIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA .....	69
IV. OBJETIVOS.....	71
Objetivos General .....	71
Objetivos Específicos .....	71
V. HIPÓTESIS .....	72
VI. MATERIAL Y MÉTODO .....	73
VII. RESULTADOS.....	76
VIII. DISCUSIÓN .....	82
IX. CONCLUSIONES .....	84
X. BIBLIOGRAFÍA .....	85

## I.-INTRODUCCIÓN

En la literatura mundial son conocidas las alteraciones que presentan diversas citocinas y moléculas proinflamatorias en los pacientes con infección crónica por VHC. Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados sólo han buscado comparar una misma variable entre dos grupos similares, o relacionar un máximo de dos variables en esta población de pacientes.

Según diversos investigadores, en pacientes con infección crónica por VHC la presencia de un estado inflamatorio crónico persistente podría estar asociado con niveles séricos elevados de óxido nítrico (NO) e insulina, que a su vez probablemente se presentarían de manera conjunta con cifras disminuidas de interleucinas proinflamatorias del tipo Th1 como la interleucina 15 (IL-15), indispensables para activar la inmunidad innata de tipo celular con el fin de limitar las infecciones virales intracelulares.

Por lo anterior, nuestra meta es realizar un estudio que inicialmente determine los valores séricos de estas tres moléculas (IL-15, NO, insulina) mismas que juegan un importante papel en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias en el tejido hepático, y que pueden ser determinantes para la evolución a cronicidad del VHC. Además, se buscará encontrar una relación entre dichas variables, con el fin de descubrir nuevos vínculos fisiopatológicos y así proponer líneas de investigación que permitan comprender más a fondo las consecuencias de esta compleja infección viral.



## II.-ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

---

---

### **A) VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC): GENERALIDADES**

A pesar de que la enorme mayoría de los avances en cuanto al diagnóstico, vías de transmisión, tipificación y tratamiento del Virus de la Hepatitis C (en adelante llamada VHC dentro del presente texto) se han dado en los últimos veinte años, ésta de ninguna manera es considerada una enfermedad nueva. Ya desde los tiempos de la Grecia clásica se conocía la relación que presentaban algunos cuadros ictericos infantiles con la ingesta de ciertos alimentos, posteriormente identificados como eventos de Hepatitis A (VHA); pero se describían otros casos similares en adultos que no contaban con los mismos antecedentes, y de los que se desconocía cuál era la vía de adquisición.

La transmisión parenteral de los procesos infecciosos no sería descrita sino hasta alrededor de 1880, sobre todo por el descubrimiento del proceso de vacunación contra la viruela. Esto revolucionó la visión que hasta ese momento se tenía de las enfermedades infecto-contagiosas, y permitió que ya hacia 1943 se diera a conocer la primera asociación entre un evento de transfusión sanguínea y el desarrollo de un cuadro de hepatitis.

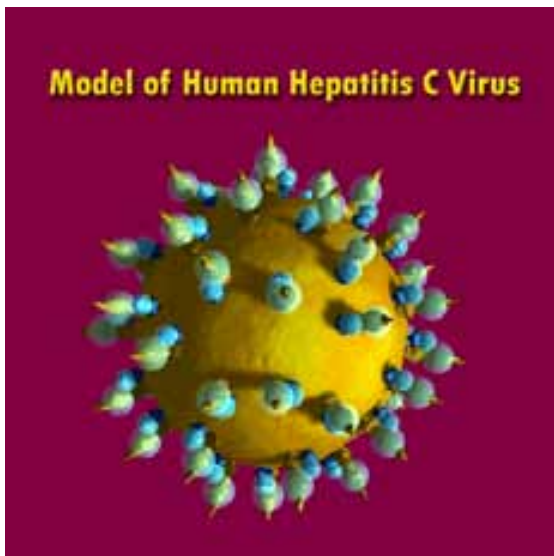
Los primeros marcadores serológicos del Virus de Hepatitis B (VHB) fueron descritos hacia 1965 por Blumberg y cols, lográndose identificar plenamente esta enfermedad dos años después. Pero fue en 1974 cuando Prince y cols integran los primeros casos de una nueva entidad que en adelante sería denominada “Hepatitis no-A no-B”, por comportarse clínicamente en forma

similar a las anteriores, pero careciendo de los marcadores serológicos de ambos virus.

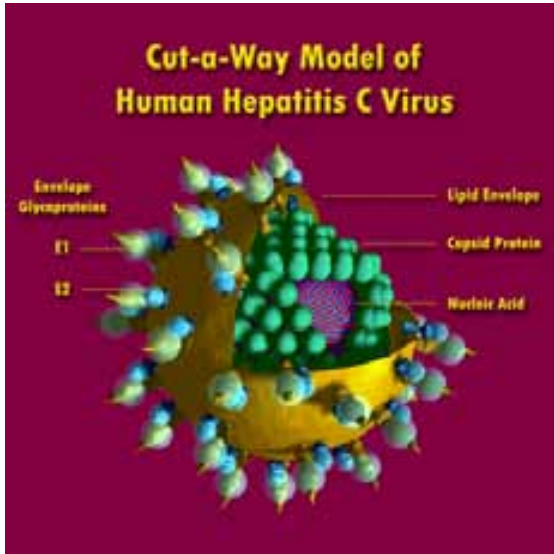
Fueron Bradley y cols quienes lograron determinar que el agente causal del mayor porcentaje de Hepatitis no-A no-B era un virus que contenía RNA como material genético. Dicho virus posteriormente sería bautizado como VHC, del que se cuenta ya con marcadores serológicos específicos para el diagnóstico, y que en la actualidad infecta a un aproximado de 170 millones de personas en todo el mundo, convirtiéndose en la primera causa de enfermedad hepática crónica en países como Estados Unidos <sup>(1)</sup>.

### **a)Virología.**

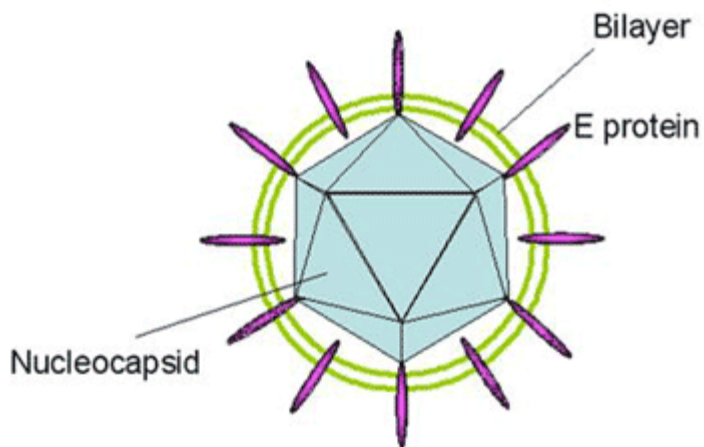
El VHC es el único miembro conocido del género *Hepaciviridae*, perteneciente a la familia *Flaviviridae* (a la que pertenecen agentes como el virus del Dengue). El genoma, consistente en una cadena sencilla de RNA, se encuentra contenido dentro de una nucleocápside proteica, envuelta a su vez por una membrana lipídica tomada de los componentes celulares del huésped, en la que quedan ancladas las glicoproteínas estructurales virales<sup>(1)</sup>(Fig. 1, 2 y 3).



**Figura 1.** Modelo de partícula de VHC vista desde el exterior. Se aprecian las proteínas estructurales en forma de espigas, recubriendo la envoltura lipídica viral.



**Figura 2.** Modelo de partícula de VHC vista en su interior. Se aprecia la nucleocápside poliédrica conteniendo el material genético viral (RNA).



**Figura 3.** Esquema del interior de una partícula de VHC, señalando la bicapa lipídica de la envoltura viral, las proteínas estructurales y la nucleocápside poliédrica.

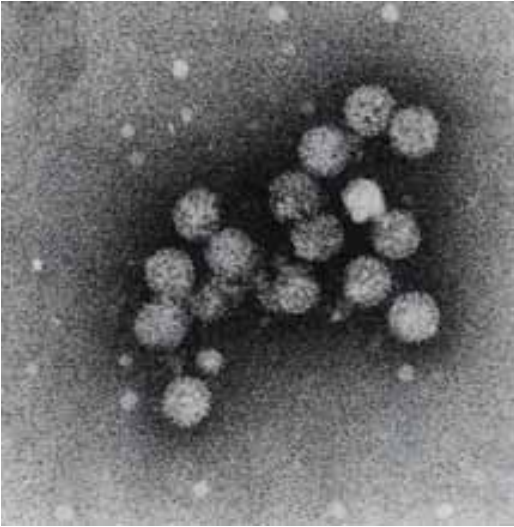
En conjunto, la partícula viral completa mide aproximadamente 50 nm de diámetro, y una vez en el huésped se han descrito dos formas de la misma:

-Fracción o de alta densidad, que es conformada por las partículas virales que circulan libres ó unidas a complejos de inmunoglobulinas;

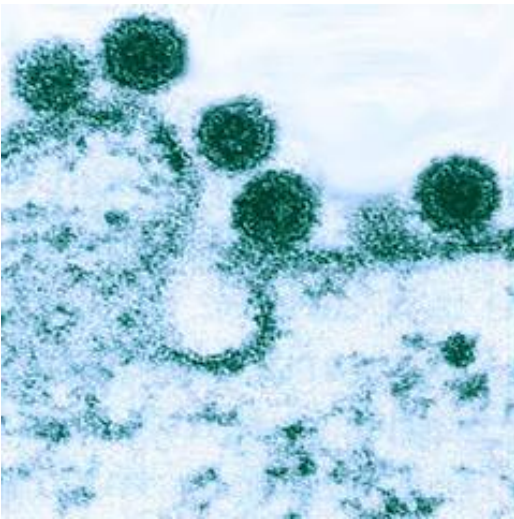
-Fracción de baja densidad, que se integra por las partículas virales que circulan unidas a moléculas de lipoproteínas de baja densidad (LDL)<sub>(1)</sub>.

Dependiendo de la expresión proteica que presente cada cepa viral en particular, se han descrito seis genotipos (1 al 6) y numerosos subtipos (descritos con las letras minúsculas a, b, c, etc.). Además, debido a que el RNA viral sufre frecuentes eventos de sustitución de nucleótidos en su cadena al entrar y replicarse en cada huésped en particular, e incluso en cada célula infectada, se desarrollan con el tiempo un gran número de “cuasiespecies”, que comienzan a surgir aproximadamente 8 semanas después de la infección inicial, y que pueden ser asociadas con el inicio de una respuesta inmune en contra del virus, provocando daño en su material genético y mutaciones puntuales. La creación de estas cuasiespecies se considera de amplio interés, debido a que se asocia con la persistencia de la infección y con disminución en la respuesta al tratamiento antiviral <sub>(1)</sub>.

El RNA del VHC contiene la información para codificar la producción de una sola poliproteína de gran tamaño y cadena única, compuesta por 3010 aminoácidos, que posteriormente se dividirá para dar lugar a la totalidad de las proteínas estructurales y no estructurales que permitirán la formación de nuevas partículas virales en el citoplasma de la célula del huésped (hepatocitos y células del tejido linfoide)<sub>(1)</sub>. Pero de las diversas proteínas virales, de los mecanismos de adherencia y entrada viral, de la replicación viral y de las alteraciones en la inmunidad del huésped provocadas por la infección se hablará con detalle más adelante en este texto (Figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Numerosas partículas de VHC vistas en el microscopio electrónico.



**Figura 5.** Partículas de VHC recién formadas, en el momento de su salida de la célula infectada, vistas al microscopio electrónico.

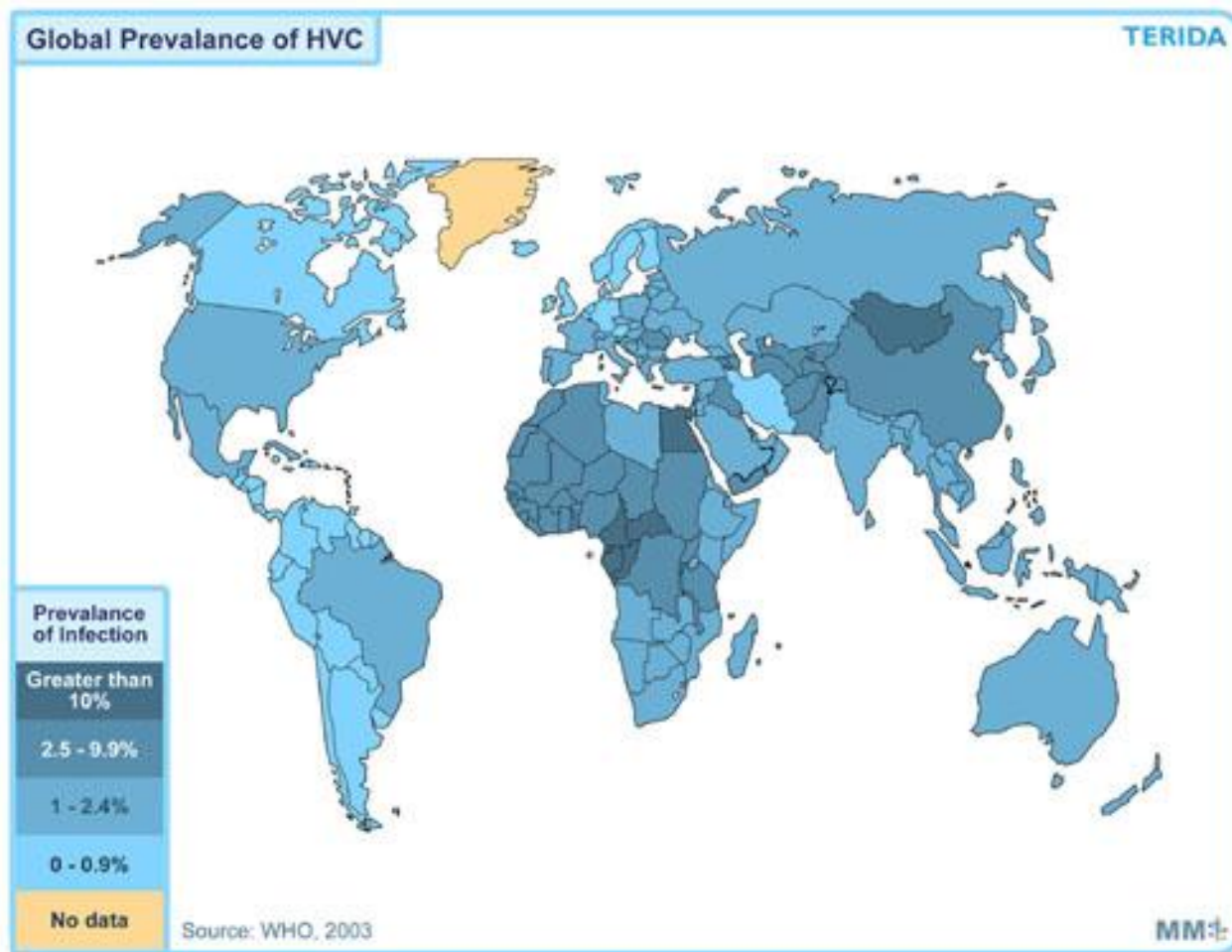
## ***b) Epidemiología y Prevalencia***

Como se mencionó antes, se calcula que en la actualidad el VHC infecta aproximadamente a 170 millones de personas en todo el mundo, por lo que es considerado un importante problema de salud pública <sup>(1,2)</sup>. Egipto es el país que presenta la más alta prevalencia de infección por VHC en el mundo, alcanzando hasta un 13% de la población, lo que equivale a un aproximado de 10 millones de personas positivas para Anti-VHC <sup>(11,12,13)</sup>. En países como Estados Unidos la prevalencia de la infección por VHC alcanza un 1.6%, que corresponde a un aproximado de 4.1 millones de personas positivas para anticuerpos contra VHC. En ese país, el VHC constituye la principal causa de muerte por enfermedad hepática, y se ha convertido en la principal indicación de Trasplante Hepático <sup>(2)</sup>. La incidencia de casos llega a ser de hasta 35,000 nuevas detecciones por año, afectando con más frecuencia a personas en etapa de adulto joven (20 a 39 años de edad), con discreto predominio en sexo masculino.

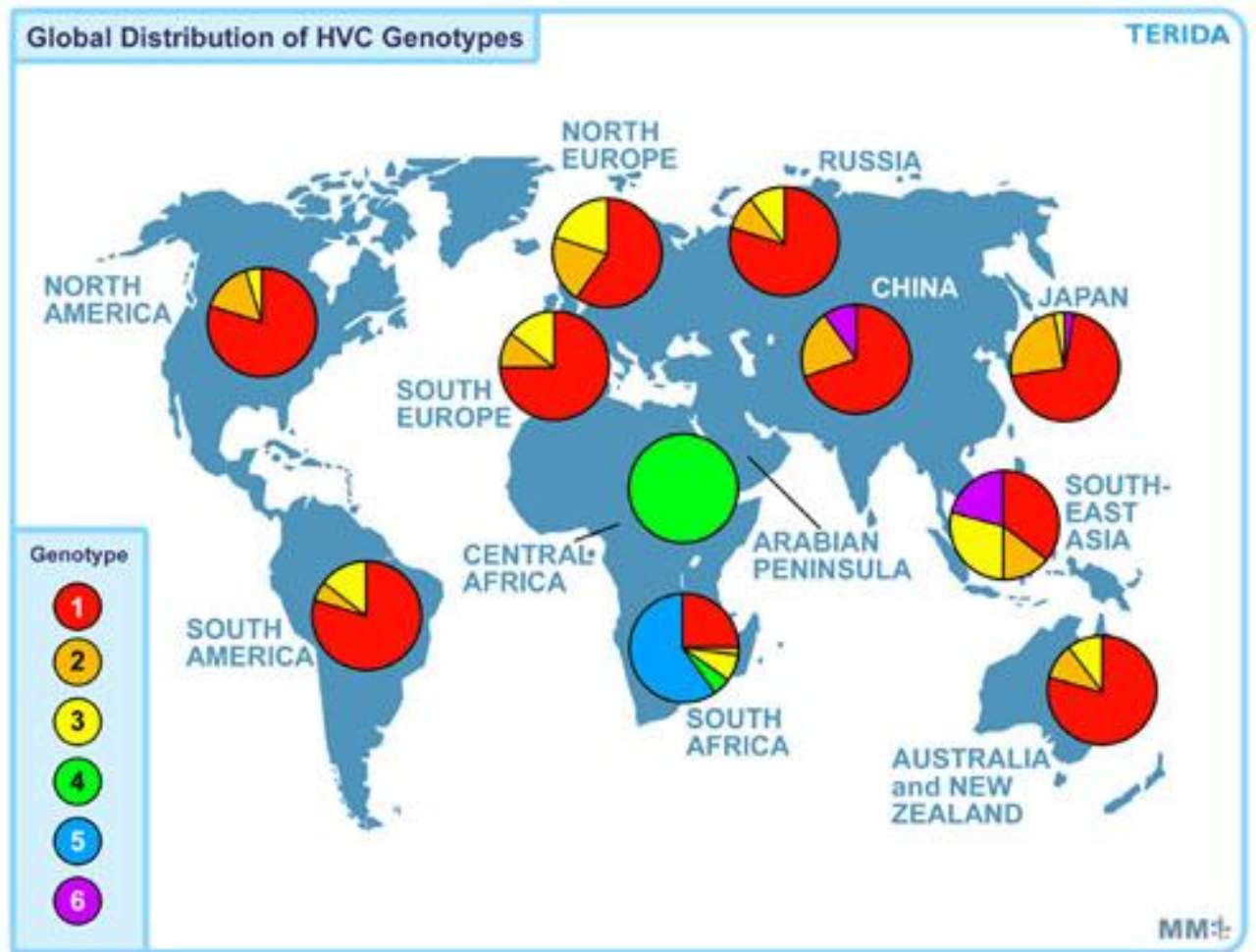
En estados unidos, el principal factor de riesgo para adquirir VHC es el uso de drogas intravenosas (hasta 60% de los casos), aunque hasta en 10 a 40% de los casos no se logra identificar un factor de riesgo evidente <sup>(1)</sup>. Otras vías de transmisión bien identificadas son por medio de transfusión de sangre contaminada antes de 1991, contacto sexual sin protección, contacto con sangre de pacientes infectados (más común en médicos y otro personal de salud) y la vía vertical (madre-hijo en el momento del parto)<sup>(1,2)</sup>.

En cuanto a los genotipos, el de mayor prevalencia en el hemisferio occidental es el 1 con sus diversos subtipos, seguido de los genotipos 2 y 3. En contraste, en Medio Oriente la prevalencia del genotipo 4 es mayor, en el sur de África el genotipo 5 ya ha sido bien identificado, y el genotipo 6 presenta alta prevalencia en Asia <sup>(3)</sup>. La figura 6 muestra la prevalencia de

casos de VHC en los distintos países, mientras que la figura 7 muestra la prevalencia por genotipo. Ambos mapas están tomados de los reportes de la OMS para el año 2003.



**Figura 6.** Prevalencia de la infección por VHC a nivel mundial. Fuente: OMS 2003. (3)



**Figura 7.** Distribución de los diversos genotipos de VHC en el mundo. Fuente: OMS 2003 <sup>(3)</sup>.



### ***c) Epidemiología y Prevalencia en México***

En general se cuenta con muy poca información oficial sobre la prevalencia de la infección por VHC en México, ya que las fuentes que se pueden consultar son en su mayoría reportes aislados de la experiencia de Centros de Especialidad que publican sus resultados en forma aislada, lo que dificulta un enfoque uniforme y con mayor peso estadístico.

De acuerdo con la revisión de seis reportes realizada en 2002 por los Doctores Nahúm Méndez y Misael Uribe <sup>(4)</sup>, la prevalencia de la infección por VHC en nuestro país alcanza un aproximado del 1.2% (1,200,000 personas infectadas), siendo los principales factores de riesgo la adquisición post-transfusional, el uso de drogas intravenosas y la promiscuidad sexual. Otros grupos que llegan a presentar riesgo hasta del 80% de infección son los hemofílicos, los pacientes con talasemias y aquellos que dependen de hemodiálisis.

En 2005 se publica el estudio del grupo coordinado por la Dra. Cisneros <sup>(5)</sup> según el cual la prevalencia de la infección por VHC en México alcanza el 1.6% en promedio, con un notable predominio de las zonas urbanas sobre las rurales (1.8 vs 1.4%), reportándose una frecuencia inversamente proporcional al nivel educativo y al ingreso económico, y siendo tres veces mayor en personas mayores de 60 años. De acuerdo a este estudio, la mayor prevalencia en México la presenta el genotipo 1 (72.2% de los casos), principalmente el grupo 1b (40.1% de los casos).

En 2006, Benítez-Arvizu y Cols. <sup>(6)</sup> reportan la prevalencia de la infección por VHC en el banco de sangre del CMN “La Raza”, tomando como muestra 5105 sujetos a quienes se buscó anticuerpo contra VHC, encontrando una prevalencia de apenas 0.19% (10/5105), con un mayor número de pacientes infectados por genotipo 2 (60%). Estos resultados llaman fuertemente la atención, debido a su discrepancia con lo reportado en otros centros.

Finalmente, en 2007, un estudio realizado en el Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos” <sup>(7)</sup> en el que se integraron 174 pacientes en un total de siete años, reporta que el promedio de edad de diagnóstico de la infección por VHC es de 49 años (22 a 69) con un 55% de los pacientes pertenecientes al sexo femenino; el genotipo con mayor prevalencia es el 1b (24.9% de los casos) seguido de 2b (23%). No se reporta probable modo de infección en este estudio, pero sí los resultados de tratamiento con PEG-IFN alfa y Ribavirina.

#### ***d) Historia Natural y Evolución de la Infección por VHC***

En la actualidad es bien sabido que la infección por el VHC puede tener diversos escenarios clínicos, que van desde las formas asintomáticas y autolimitadas hasta la cirrosis descompensada y el hepatocarcinoma. Además, en algunos casos la infección crónica por VHC puede relacionarse con una serie de manifestaciones extrahepáticas, muchas de las cuales comprenden mecanismos de tipo autoinmunitario <sup>(8)</sup>. A grandes rasgos, la evolución de la infección por VHC se puede dividir en los siguientes rubros: Hepatitis Aguda, Hepatitis Crónica, Cirrosis y Hepatocarcinoma y Manifestaciones Extrahepáticas <sup>(1,8)</sup>.

##### **-Hepatitis C Aguda**

Las características de la Hepatitis Aguda por VHC fueron descritas entre 1970 y 1980 en pacientes con hepatitis postransfusional identificados durante el curso de un estudio prospectivo de la que entonces era conocida como Hepatitis No-A No-B <sup>(8)</sup>.

El periodo de incubación del VHC es de 8 semanas en promedio, aunque puede variar desde 2 hasta 26 semanas <sup>(9)</sup>, tiempo durante el cual el virus se replica y provoca necrosis e inflamación de los hepatocitos. La infección aguda por VHC es asintomática hasta en 75% de los casos; las manifestaciones clínicas más frecuentes en los casos sintomáticos son astenia, alteraciones digestivas inespecíficas, coluria, y ocasionalmente ictericia. Las formas graves de hepatitis aguda son raras, y la capacidad del VHC para provocar hepatitis fulminante aún es motivo de controversia <sup>(10)</sup>.

En un artículo de revisión publicado recientemente por el Dr. Kamal Sanaa <sup>(11)</sup>, en el que se analizaron 23 estudios con un total de 966 casos de VHC agudo publicados en todo el mundo, se menciona que la incidencia anual de

estos cuadros ha disminuido gradualmente, principalmente por las campañas de educación a la población sobre las vías de adquisición, junto con un aumento en la calidad en el rastreo y detección del virus en sangre obtenida de donadores. Un punto importante mencionado en este artículo es que aún no existen pruebas confiables que nos permitan predecir qué pacientes presentarán resolución espontánea del VHC tras la infección aguda, y qué pacientes evolucionarán a cronicidad.

Dentro de los 23 estudios analizados por Sanaa, los porcentajes estimados de resolución espontánea de la infección tras el cuadro agudo varían entre un 10 y un 60%, mientras que del 43 al 86% presentarán persistencia de la infección y evolución a cronicidad. Hasta el 80% de los casos que presentarán depuración espontánea del virus lo harán dentro de los primeros 3 meses desde el inicio de la infección, mientras que la detección positiva de RNA del VHC después de 6 meses del cuadro inicial se traduce en cronicidad <sup>(11)</sup>.

Un abordaje que aún resulta intrigante es el de brindar tratamiento antiviral a todos los pacientes con infección aguda por VHC, en vez de esperar a determinar quiénes autolimitarán la infección. Múltiples protocolos han mostrado que el brindar tratamiento para la infección aguda por VHC se asocia con un porcentaje de respuesta viral sostenida (RVS) que puede ser tan alto como de un 75 a un 100%. Sin embargo, aún no existe consenso sobre las dosis y tiempo de medicación que se debe brindar a los pacientes con Hepatitis C aguda, por lo que esto aún es motivo de debate <sup>(2,11)</sup>. Entre los tratamientos que se han investigado se encuentran: Interferón (INF) alfa convencional (no pegilado) en dosis de 3 a 6 millones de unidades tres veces por semana, por 4 a 24 semanas; PEG-IFN alfa 2b a dosis de 1 a 1.5mcg/kg/semana por 12 a 24 semanas, sin Ribavirina; y PEG-IFN alfa 2b (1 a 1.5 mcg/kg/sem) más Ribavirina (800mg/día) por 8 a 12 semanas. Sin embargo el papel que juega la Ribavirina en el tratamiento del cuadro agudo por VHC aún no ha quedado totalmente demostrado, y prácticamente todos

estos esquemas han sido publicados en estudios pequeños, abiertos, no comparativos, que sólo consideran pequeños grupos de pacientes, por lo que aún no existe un consenso bien establecido <sup>(14)</sup>.

### -Hepatitis C Crónica

La Hepatitis C Crónica es el resultado de depurar la infección por el VHC durante varios años, acompañada de inflamación y necrosis persistente del tejido hepático secundaria a la reacción inmunológica desencadenada por el virus, de la que se hablará con detalle más adelante. La intensidad de las alteraciones hepáticas y la capacidad que tengan de generar daño grave e irreversible varían entre los distintos pacientes <sup>(8)</sup>.

Los diversos reportes presentan datos que pueden ser contradictorios con respecto a la evolución crónica del VHC. Algunos estudios sugieren que la infección puede tener un carácter benigno, con pacientes que permanecen asintomáticos durante largo tiempo y que presentan alteraciones bioquímicas y lesiones hepáticas mínimas o no significativas <sup>(15,16)</sup>. Por el contrario, otros informes muestran una evolución progresiva en la que 10 a 77% de los pacientes acabarán desarrollando cirrosis tras un número variable de años de seguimiento <sup>(17)</sup>.

Entre los factores relacionados con la progresión a cronicidad de la infección por VHC se encuentran: mayor edad al momento de la infección, género masculino, raza no caucásica, índice de masa corporal incrementado, genotipo viral tipo 1, incremento de la diversidad de cuasiespecies (ver arriba), consumo de alcohol mayor de 40 a 50g/día y coinfección con virus de la hepatitis B o VIH <sup>(1,8)</sup>.

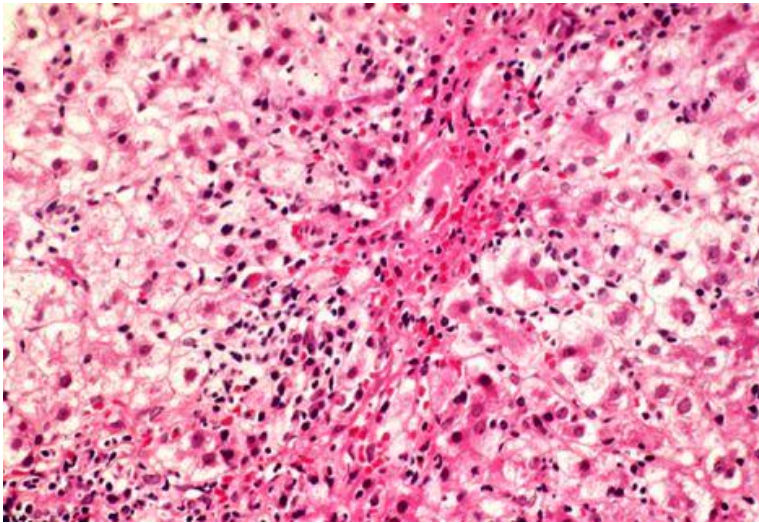
En general, la infección crónica por VHC se puede dividir en tres subgrupos según su evolución:

→**Hepatitis C Crónica con Aminotransferasas Normales** <sup>(8)</sup>, que abarca hasta el 20% de los pacientes que desarrollan cronicidad, y que presenta una incidencia de cirrosis tan baja como del 0.5 al 6%. Este grupo se asocia con mínimas tasas de proliferación de hepatocitos y de apoptosis y daño histológico moderado. El tratamiento de estos pacientes aún se encuentra sujeto a debate, pero por consenso todavía no se recomienda instituir terapéutica.

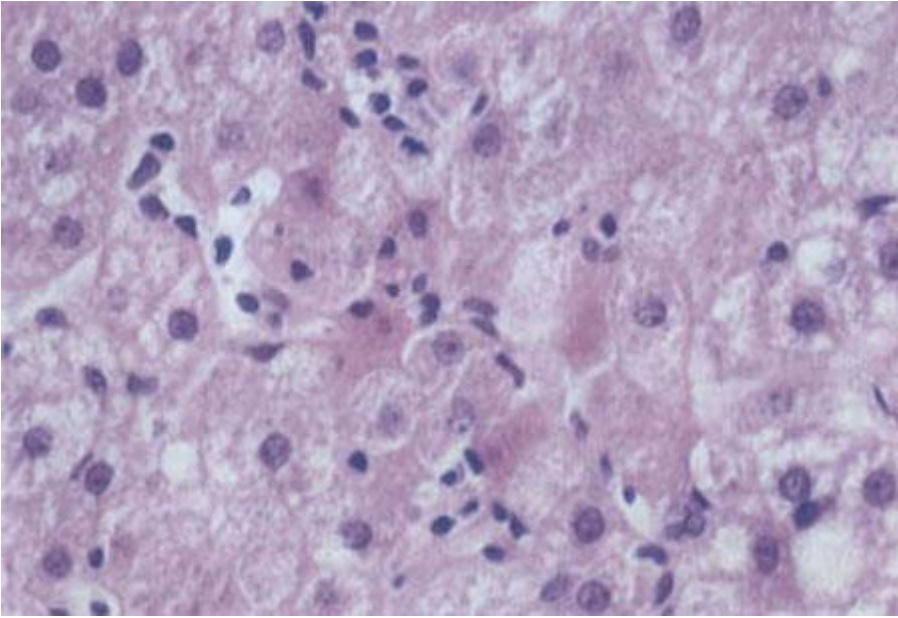
→**Hepatitis C Crónica Leve** <sup>(8)</sup>, que probablemente sea la forma de presentación más frecuente de presentación de la infección por VHC. Por lo general, los pacientes permanecen asintomáticos, con alteraciones bioquímicas mínimas y cambios en la biopsia que reportan fibrosis portal escasa o ausente. La diferencia con el grupo anterior es que estos pacientes sí presentan elevación de las cifras de aminotransferasas, y aunque sus lesiones suelen mantenerse estables por años, algunos casos pueden progresar rápidamente a cirrosis <sup>(18,19)</sup>.

→**Hepatitis C Moderada o Grave** <sup>(8)</sup>, que se caracteriza por la presencia de lesiones necroinflamatorias en la biopsia hepática, acompañadas de fibrosis portal y periportal. Estas lesiones pueden alterar la arquitectura normal del hígado y a veces sugieren la presencia de cirrosis. Alrededor del 25% de los pacientes que pertenecen a esta categoría tiene un alto riesgo de progresar hacia cirrosis. En este grupo, además de una elevación persistente de aminotransferasas, se puede detectar elevación de Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGT), Ferritina sérica e Inmunoglobulinas, además de una importante disminución en la cuenta plaquetaria –mediada por mecanismos de autoinmunidad, y no por lisis secundaria a hipertensión portal (HTP)-. Este

grupo es el que presenta, junto con el anterior, la principal indicación para iniciar tratamiento antiviral <sup>(1,8,20)</sup>. Como tratamiento contra la trombocitopenia inducida por VHC se han intentado diversos fármacos aún en estudio, como es el caso de Danazol, un análogo con función corticoesteroide <sup>(21)</sup>, y Eltrombopag, un agonista de receptores de trompoyetina <sup>(21,22)</sup> que estimula la trombopoyesis con el fin de lograr conteos plaquetarios suficientes para lograr iniciar tratamiento antiviral en pacientes VHC positivos con trombocitopenia importante, aunque ninguno de estos tratamientos ha modificado realmente la terapéutica de la enfermedad hasta el momento. (Fig. 8 y 9)



**Figura 8.** Cambios histológicos en biopsia hepática de pacientes con infección crónica por VHC. Se aprecia un importante infiltrado por células inflamatorias y proliferación de tejido conectivo.



**Figuras 9.** Cambios histológicos en biopsia hepática de pacientes con infección crónica por VHC. Se aprecia arquitectura hepática distorsionada, con núcleos de hepatocitos destruidos distribuidos entre el resto del tejido.

#### -Cirrosis y Hepatocarcinoma

La transición de la infección crónica por VHC a cirrosis es incidiosa y sin manifestaciones clínicas aparentes <sup>(8)</sup>. Una vez que el estadio histológico de cirrosis se alcanza, los pacientes pueden permanecer asintomáticos por un largo periodo de tiempo y la descompensación suele ocurrir en etapas tardías.

Los factores que se consideran como de alto riesgo para desarrollar cirrosis son RNA de VHC detectable en sangre e histología con fibrosis estaido >F2 de METAVIR ó >3 Ishak <sup>(2)</sup>.

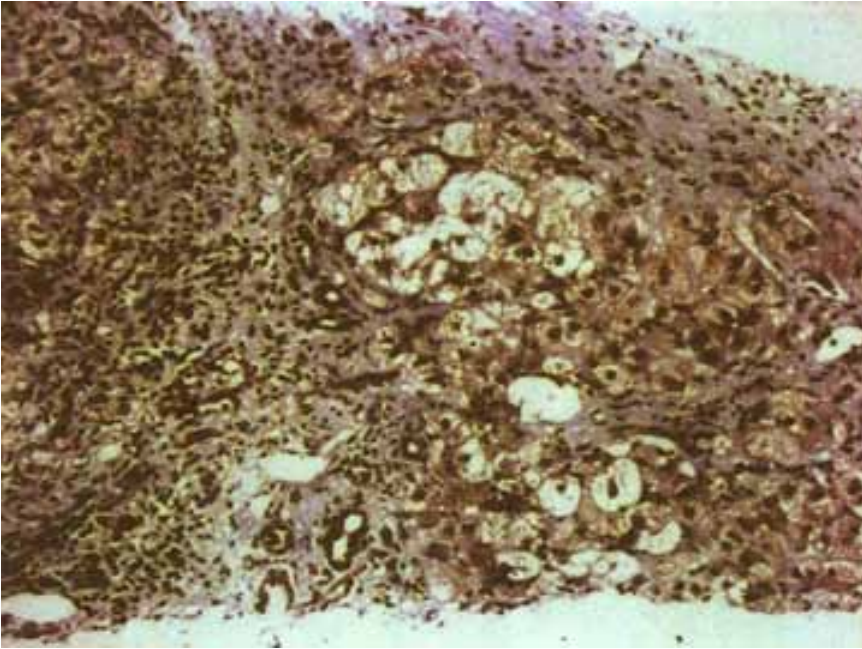
En general, 20 a 40% de los pacientes con infección crónica por VHC desarrollarán cirrosis en un periodo de 30 años, y tras la aparición de cirrosis,



10 a 20% de pacientes presentarán descompensación importante de su enfermedad en cinco años. El riesgo de hepatocarcinoma en pacientes con cirrosis es de 1 a 6% por año <sup>(1,2,8)</sup>.

Por otro lado, la relación entre VHC y hepatocarcinoma (HCC) ha sido bien establecida. Algunos estudios reportan que hasta en más del 70% de los pacientes con hepatocarcinoma es posible detectar marcadores de infección por VHC. El principal factor relacionado con la aparición de HCC en el contexto de la infección crónica por VHC es la presencia de cirrosis <sup>(1,2,8)</sup>. La edad mayor a 55 años, el género masculino y la elevación de alfafetoproteína son los factores que más se vinculan con HCC en pacientes con cirrosis compensada <sup>(8)</sup>. Aunque se cree que el genotipo 1b se vincula con el desarrollo de HCC, esto aún no ha sido confirmado, y es probable que se deba sólo a una relación epidemiológica <sup>(1,2)</sup>.

Los mecanismos carcinógenos del VHC no están bien establecidos; es posible que genes de la proteína Core del virus –de la que se hablará más adelante– modulen la transcripción genética, la proliferación y la muerte celular, e influyan en la formación del tumor <sup>(1,8,54)</sup>. (Fig. 10)



**Figura 10.** Cirrosis hepática secundaria a infección crónica por VHC, tinción de Masson (530x). Se observan bandas de colágeno con formación de pequeños nódulos de regeneración.

#### -Manifestaciones Extrahepáticas del VHC

El abordaje profundo de las manifestaciones extrahepáticas del VHC queda fuera del motivo de este texto. Sin embargo, es importante mencionar algunos datos generales:

La relación entre VHC y crioglobulinemia mixta ha sido claramente definida <sup>(24,25,26)</sup>. De acuerdo con diferentes estudios, hasta 60 a 90% (promedio 80%) de pacientes en quienes se diagnostica crioglobulinemia mixta resultan positivos para marcadores serológicos de VHC, y en contraparte, hasta 20 a 40% del total de los casos de crioglobulinemia mixta (promedio 30%) son provocados por el VHC <sup>(25,26)</sup>. Además, se ha descrito la identificación de RNA viral en el crioprecipitado de estos pacientes, y por lo menos en forma inicial el cuadro de crioglobulinemia mejora al comenzar tratamiento con

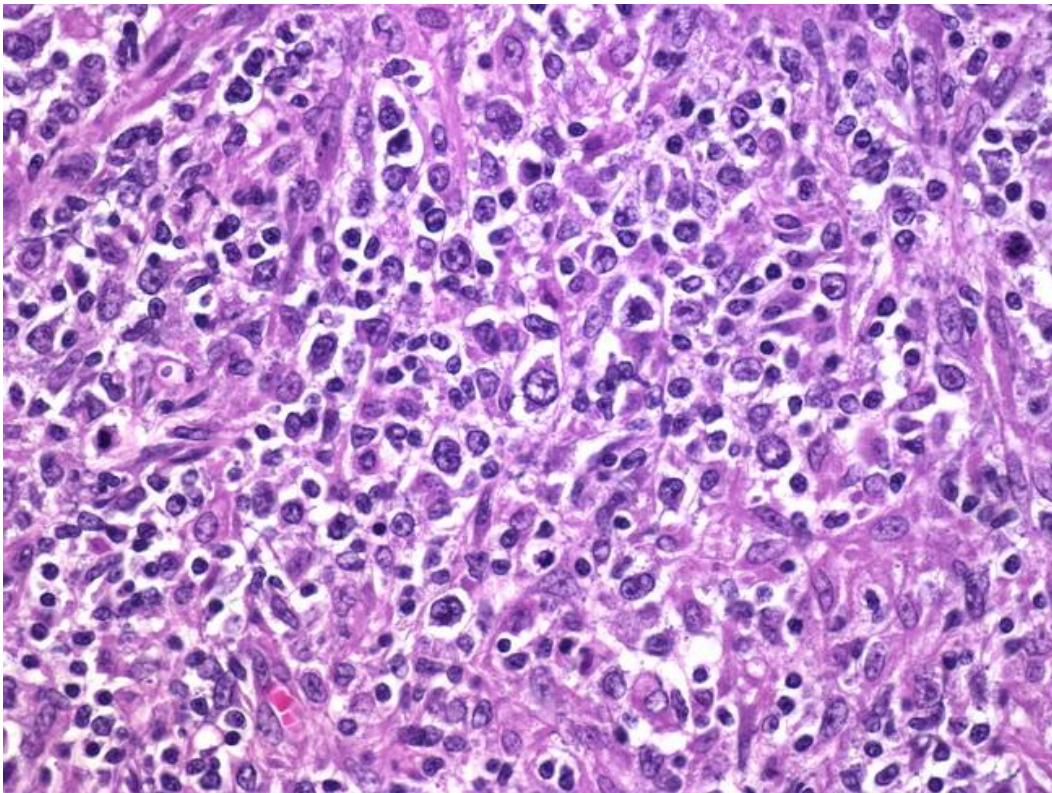
interferón. Finalmente, hasta en 30% de los pacientes con infección crónica por VHC pueden detectarse crioglobulinas séricas, probablemente explicadas por la activación de linfocitos B secundario al linfotropismo del VHC. Hasta la fecha se desconoce por qué sólo una parte de los pacientes VHC positivos en quienes se detectan crioglobulinas séricas presentan manifestaciones clínicas de crioglobulinemia mixta <sup>(8,24)</sup>.(Fig. 11)



**Figura 11.** Fotografía de lesiones en miembros pélvicos en paciente con crioglobulinemia mixta asociada a VHC

Un ejemplo más del linfotropismo del VHC lo representa el Linfoma No Hodgkin (LNH) <sup>(25,26)</sup>, aunque la asociación aún no ha sido evidenciada con mismo peso estadístico en comparación con crioglobulinemia mixta. Los reportes de prevalencia varían ampliamente en diversos países, y muchos estudios comprenden series pequeñas de pacientes no aleatorizadas. Sin

embargo, los pacientes VHC positivos parecen presentar un riesgo hasta 2 a 4 veces mayor de desarrollar LNH en comparación con la población general, principalmente de células B difusas de células grandes, presentando además un peor pronóstico en comparación con pacientes que presentan LNH no asociados a VHC. Aunque la causa por la que VHC desarrolla LNH no ha sido bien establecida, el linfotropismo viral, diversos polimorfismos de Interleucina 10 (IL-10), la interacción de la proteína de superficie E2 con los receptores CD81 de los linfocitos (tema que se explicará con más detalle en páginas posteriores), y la conjunción de factores ambientales y genéticos parecen ofrecer hipótesis adecuadas <sup>(26,55)</sup>.(Fig. 12)



**Figura 12.** Linfoma No Hodgkin tipo B de células grandes en bazo, en paciente con infección crónica por VHC

Finalmente, otras patologías como la glomerulonefritis membranosa, la porfiria cutánea tarda y el síndrome de sicca también han sido vinculada con

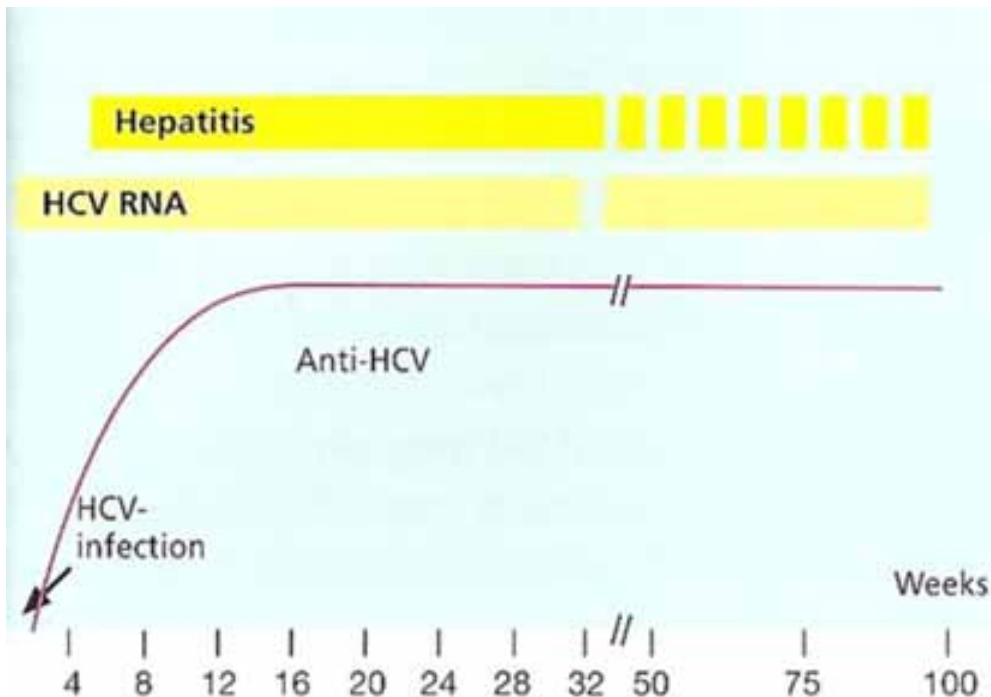
la infección por VHC <sup>(8,25)</sup>. Otras probables manifestaciones extrahepáticas que sólo han sido reportadas en casos aislados o de manera anecdótica son síndrome antifosfolípidos, tiroiditis autoinmunitaria, síndrome de Behcet, prurigo nodular de Hyde, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, úlcera corneal de Mooren, plasmocitoma, poliarteritis nodosa (esta con mucho menor frecuencia en comparación con pacientes infectados por Virus de Hepatitis B) y vitíligo <sup>(8)</sup>.

### ***e) Diagnóstico de la infección por VHC***

El diagnóstico del VHC por medio de la demostración directa de antígenos virales no es posible, debido a que los títulos séricos del virus pueden ser muy bajos (entre  $10^4$  y  $10^7$  por ml en la mayoría de los pacientes) lo que disminuye en forma importante la sensibilidad de las pruebas inmunológicas (27).

Por lo anterior, el diagnóstico de la infección por VHC en la actualidad se realiza por medio de la detección de anticuerpos circulantes. Las pruebas por ELISA de tercera generación se realizan mediante la combinación de cuatro diferentes antígenos, con el fin de detectar anticuerpos Anti-VHC específicos. En caso de requerir una prueba confirmatoria, se puede emplear RIBA (Recombinant Immunoblot tests), en la cuál se puede leer la reacción antígeno-anticuerpo en forma individual. Sin embargo, la prueba diagnóstica de confirmación de elección en la actualidad (“estándar de oro”) es la detección y cuantificación sérica de RNA viral. Esta última prueba ha demostrado en varios estudios que, posterior a una infección aguda por VHC, hasta 95% de los pacientes permanecerán positivos para RNA viral en los siguientes años (27), hecho que también está influyendo en los programas de tratamiento para VHC agudo (2,11).

Los anticuerpos Anti-VHC pueden ser detectables 2 a 6 semanas después de la infección por medio de ELISA de tercera generación con una sensibilidad hasta del 99% (27). La seroconversión después de más de 6 meses es sumamente rara. En los pacientes con infección aguda que logran depurar el virus en forma espontánea, los títulos de Anti-VHC generalmente se vuelven negativos alrededor de 6 meses después del inicio de la enfermedad (11,27). (Fig. 13)



**Figura 13.** Esquema de la evolución típica, tanto clínica como de laboratorio, de la infección por VHC

**f) Tratamiento de la infección Crónica por VHC** (1,2,8,28,29,30,34)

Las principales metas del tratamiento de la infección crónica por VHC son frenar la progresión de la enfermedad, prevenir las complicaciones y el desarrollo de cirrosis, prevenir el desarrollo de HCC y, en su caso, manejar las manifestaciones extrahepáticas de la enfermedad.

En la actualidad, los fundamentos de la terapia contra VHC los constituyen el Interferón pegilado alfa (PEG-IFN alfa 2a o 2b) y la Ribavirina, aunque numerosos medicamentos nuevos se encuentran en fase de investigación.

Las principales contraindicaciones para recibir tratamiento contra VHC son:

- Enfermedad extrahepática severa descompensada

- Hepatopatía descompensada (Child-Pugh B alto o C)
- Padecimiento autoinmune descontrolado
- Embarazo, plan de embarazarse o negativa para utilizar anticoncepción durante el tratamiento
- Pobre apego al tratamiento
- Enfermedad psiquiátrica severa descompensada
- Uso actual de drogas o alcohol
- Incapacidad para administrar el medicamento

De manera general, los datos que sugieren función hepática preservada, y que permiten el inicio de tratamiento con bajo riesgo, son: Bilirrubinas <1.5, INR <1.5, Albúmina sérica >3.4, y no evidencia de encefalopatía o ascitis.

Es importante mencionar que los niveles de aminotransferasas previos al inicio de tratamiento no correlacionan con el daño histológico, ya que hasta 20% de los pacientes con ALT normal presentan fibrosis estadio II o mayor por biopsia.

La respuesta a tratamiento se define de tres maneras:

-Respuesta Viroológica, que consiste en reducción en los niveles séricos de RNA de VHC

-Respuesta Bioquímica, que consiste en una normalización en las cifras de ALT

-Respuesta Histológica, que consiste en disminución en los índices de fibrosis e inflamación en la biopsia hepática.

De las anteriores, la respuesta bioquímica y la respuesta virológica se asocian en alto porcentaje con la respuesta histológica, por lo que repetir la biopsia hepática después de completado el tratamiento antiviral no está indicado. Además, si se cuenta con niveles de ALT y de RNA viral, la biopsia puede no ser indispensable para iniciar tratamiento, aunque se recomienda contar con biopsia inicial en pacientes que presentan infección por VHC genotipo 1.



Existen cuatro definiciones de respuesta viral una vez instituido el tratamiento, y que son importantes para decidir en qué momento se debe continuar o suspender el mismo, y que además sirven como auxiliares para determinar el pronóstico de los pacientes con infección crónica por VHC:

**-Respuesta Viral Rápida (RVR)**, que se define como la detección de niveles de RNA de VHC menores a 50 UI/ml a la semana 4 de iniciado el tratamiento.

**-Respuesta Viral Temprana (EVR)**, que se determina por la disminución de  $>2$  log<sub>10</sub> en los niveles séricos de RNA de VHC en comparación con los niveles basales, cuantificados a la semana 12 de iniciado el tratamiento.

**-Respuesta al Final del Tratamiento (ETR)**, que se establece con niveles indetectables de RNA de VHC al finalizar el tratamiento antiviral.

**-Respuesta Viral Sostenida (SVR)**, que se define como la presencia de niveles indetectables de RNA de VHC a las 24 semanas (6 meses) de haber finalizado el tratamiento.

Una **recidiva** viral se diagnostica cuando los niveles de RNA de VHC se vuelven nuevamente detectables al suspender los medicamentos antivirales, a pesar de que hubiesen estado negativos durante el tratamiento; y un **paciente no respondedor** se define como aquel caso que mantiene niveles permanentemente detectables de RNA de VHC a lo largo del tratamiento. En este grupo se integra principalmente a los pacientes que a las 12 o 24 semanas de tratamiento, según sea el caso, no presentan cambios en los niveles de RNA viral.

En general, el manejo que los diversos consensos mundiales recomiendan en la actualidad para pacientes que no han recibido tratamiento previamente (“naïve”) consiste en administrar PEG-IFN alfa2A en dosis de 180mcg/sem, o PEG-IFN alfa2B en dosis de 1 a 1.5mcg/kg/sem + Ribavirina a dosis de 1000mg/día (si el peso del paciente es  $<75$ kg) o 1200mg/día (si el peso es

>75kg). Si se trata de un portador de genotipo 1, el tratamiento arriba mencionado se continúa por 48 semanas en promedio, con un porcentaje de SVR hasta del 52%; mientras que si se trata de un portador de genotipo 2 o 3 el tratamiento se brinda por un promedio de 24 semanas. En este último grupo de pacientes, si los niveles de RNA de VHC son bajos previo al inicio del tratamiento (<600,000 UI/ml), y no hay adecuada tolerancia a los fármacos, el tiempo de tratamiento puede ser reducido a 12 o 16 semanas siempre que se demuestre buena RVR o EVR, esto según el criterio del médico tratante.

En los pacientes que tienen contraindicaciones para recibir Ribavirina, existen reportes que han intentado brindar tratamiento sólo mediante monoterapia con PEG-IFN alfa, pero en todos los casos la SVR es menor.

De manera amplia, los porcentajes de SVR que se obtienen mediante el esquema clásico de tratamiento arriba mencionado (PEG-IFN alfa + Ribavirina) es de 54 a 56% en todos los genotipos, con un 42 a 54% en los pacientes con genotipo 1, y un 76 a 84% en pacientes con genotipos 2 o 3.

Los predictores de buena respuesta a tratamiento establecidos en las revisiones y consensos internacionales son:

- Genotipo no 1
- Niveles bajos de RNA de VHC
- Ausencia de fibrosis/cirrosis en al biopsia inicial
- Duración del tratamiento (en el caso de genotipo 1)
- Edad <40 años
- No obesidad o sobrepeso
- Grupo étnico distinto al afroamericano
- Buen apego a tratamiento
- Ausencia de esteatosis en la biopsia inicial

Por el contrario, los factores que predicen mala respuesta al tratamiento se dividen en dos grupos, que son:

### **1.-Predictores basales:**

- Infección por genotipo 1 (*es el principal factor predictivo negativo antes del inicio del tratamiento*)
- Niveles elevados de RNA de VHC pre-tratamiento
- Edad >40 años
- Índice de masa corporal (IMC) elevado
- Cirrosis en la biopsia inicial

## **2.-Predictores negativos durante el tratamiento:**

- Ausencia de RVR o de EVR (*son los principales factores predictores negativos durante el tratamiento*)

Ampliando el punto anterior, se ha observado que los pacientes que a las 12 semanas de tratamiento (sdt) alcanzan una adecuada EVR tienen hasta 65 a 76% de posibilidades de alcanzar SVR. Por el contrario, los casos que no alcanzan EVR tienen menos del 3% de posibilidad de alcanzar SVR, por lo que la EVR a las 12 sdt se considera como el punto para decidir si vale la pena continuar el tratamiento, o si es mejor suspenderlo definitivamente según cada caso particular.

Estudios recientes muestran que en algunos pacientes con infección por genotipo 1 que alcanzan excelente RVR –definida como niveles de RNA de VHC indetectables a la 4ª sdt—se puede considerar reducir el tiempo de tratamiento a 24 semanas, manteniendo en mente el riesgo de recaída viral.

También en los pacientes con genotipo 1 se ha observado que, de persistir con RNA de VHC detectable a las 24 sdt las probabilidades de alcanzar SVR son menores al 1%, por lo que se debe suspender el tratamiento antiviral definitivamente.

En cuanto a los portadores de VHC genotipo 3, se ha observado que estadísticamente presentan menor SVR que los pacientes con genotipo 2 (66-79% vs 80-93%). Además los casos con genotipo 3 que previo al inicio del tratamiento muestran niveles de RNA >600,000 UI/ml o esteatosis en la biopsia presentan un mayor riesgo de recaídas virales una vez finalizado el

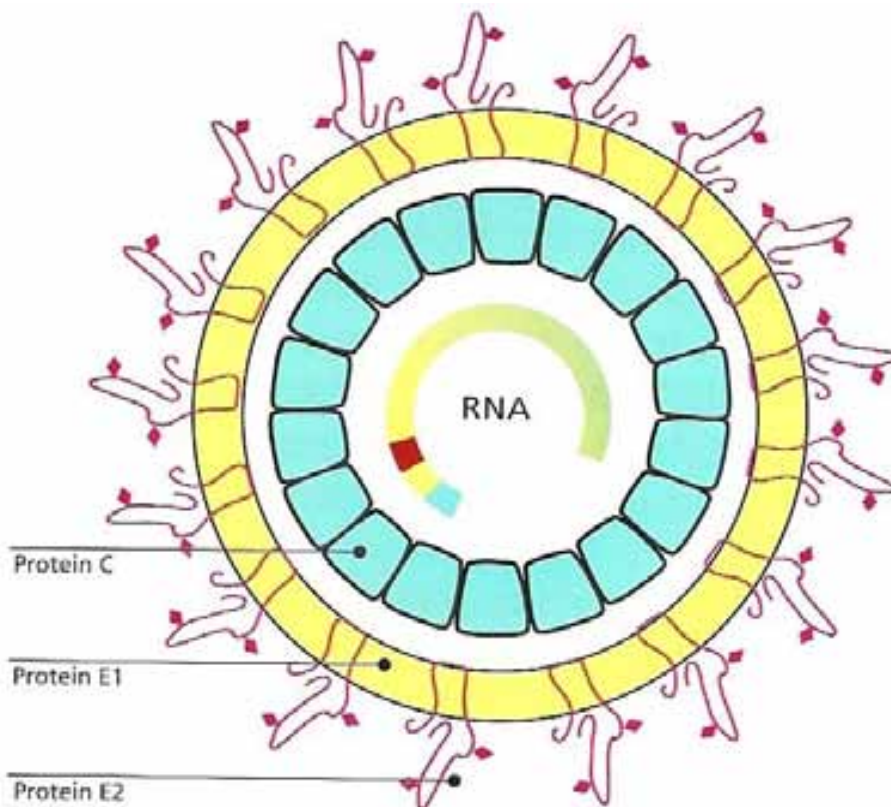
mismo. Por lo anterior, algunos autores recomiendan llevar el tratamiento de estos pacientes más allá de las 24 semanas, con el fin de aumentar la SVR.

## B) BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VHC

El conocimiento de la biología molecular y de la estructura viral del VHC resulta básico en la actualidad para abordar los nuevos avances en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos asociados con la infección, así como para comprender los nuevos tratamientos antivirales que se encuentran en investigación. El papel que juegan las diversas proteínas virales, el ciclo de replicación celular, y las vías de entrada del VHC a las células del huésped se describen a continuación en forma detallada.

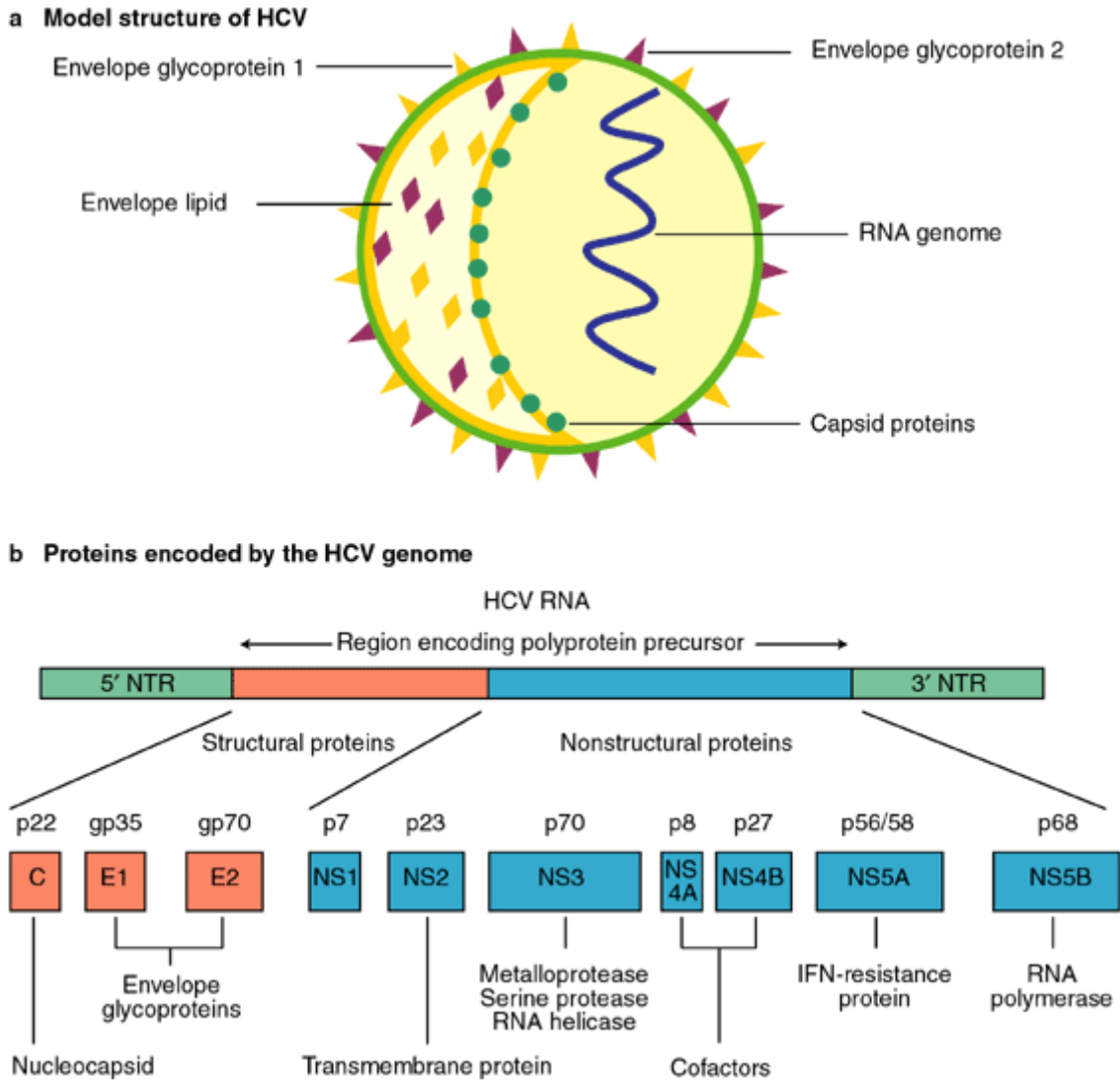
### **1.-Proteínas constitutivas del VHC** (31,34,56,57)

Como se mencionó anteriormente, el VHC está constituido por tres elementos principales: material genético (RNA de cadena sencilla), nucleocápside protéica y envoltura lipídica que contiene las proteínas de fijación y entrada viral (Fig. 14).

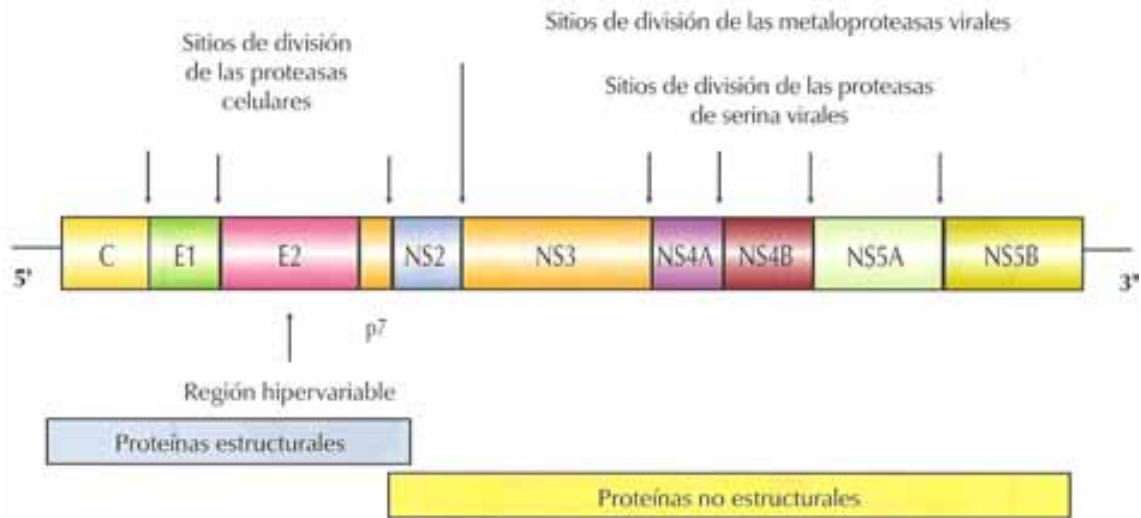


**Figura 14.** Esquema básico de la estructura molecular del VHC. Se aprecia en el centro el RNA de cadena sencilla rodeado por la nucleocápside protéica (proteína C o Core, en azul). Ambos elementos se encuentran contenidos dentro de la envoltura lipídica viral (en amarillo) en la que se encuentran insertadas las proteínas de la envoltura E1 y E2, que juegan un papel determinante en el comportamiento inmunogénico del virus.

El RNA de VHC, muy similar al del resto de los flavivirus y que fue identificado desde hace aproximadamente 19 años, contiene la información suficiente para codificar una sola proteína de alto peso molecular (poliproteína) constituida aproximadamente por 3010 aminoácidos. Esta poliproteína es posteriormente segmentada mediante la acción de proteasas tanto virales como de la célula infectada para generar diez polipéptidos, originalmente contenidos en una sola Región Codificadora o marco abierto de lectura (*Open Reading Frame, ORF*)(Fig. 15 y 16), cada uno de los cuales presenta funciones específicas totalmente distintas que se describen a continuación.



**Figura 15.** Poliproteína codificada por el RNA de VHC. Se aprecia la manera en la que es segmentada para dar lugar a 10 polipéptidos con actividades específicas. En rojo y azul se aprecia la región codificante u ORF, y en verde se esquematizan los segmentos terminales no codificantes.



**Figura 16.** Detalle de la poliproteína codificada por el RNA de VHC, marcando la división entre las proteínas estructurales (*Structural, S*) y las no estructurales (*Non-Structural, NS*) que surgirán posterior a la segmentación de la misma. Se hace hincapié en la zona conocida como “Región Hipervariable” (HVR) en la región del polipéptido E2, que juega un papel determinante en el desarrollo de cuasiespecies, así como en la resistencia viral.

### a) Proteína C o Core

La proteína Core (nuclear) es un polipéptido capaz de fijar el RNA, y que constituye la nucleocápside viral. Consta a su vez de dos subunidades: una porción hidrofílica (D1) y una hidrofóbica (D2), siendo esta última indispensable para lograr la adecuada conformación de la nucleocápside. Poco se conoce acerca de la función de la proteína C, pero se sugiere que su unión a fosfolípidos permite la integración de péptidos que finalmente protegerán el RNA viral. La proteína C interactúa con una amplia variedad de proteínas de la célula huésped, y logra influir en numerosas funciones celulares como señalización, apoptosis, carcinogénesis y metabolismo de lípidos, por lo que se considera que es uno de los elementos que participa en el desarrollo de HCC en pacientes con infección crónica por VHC.

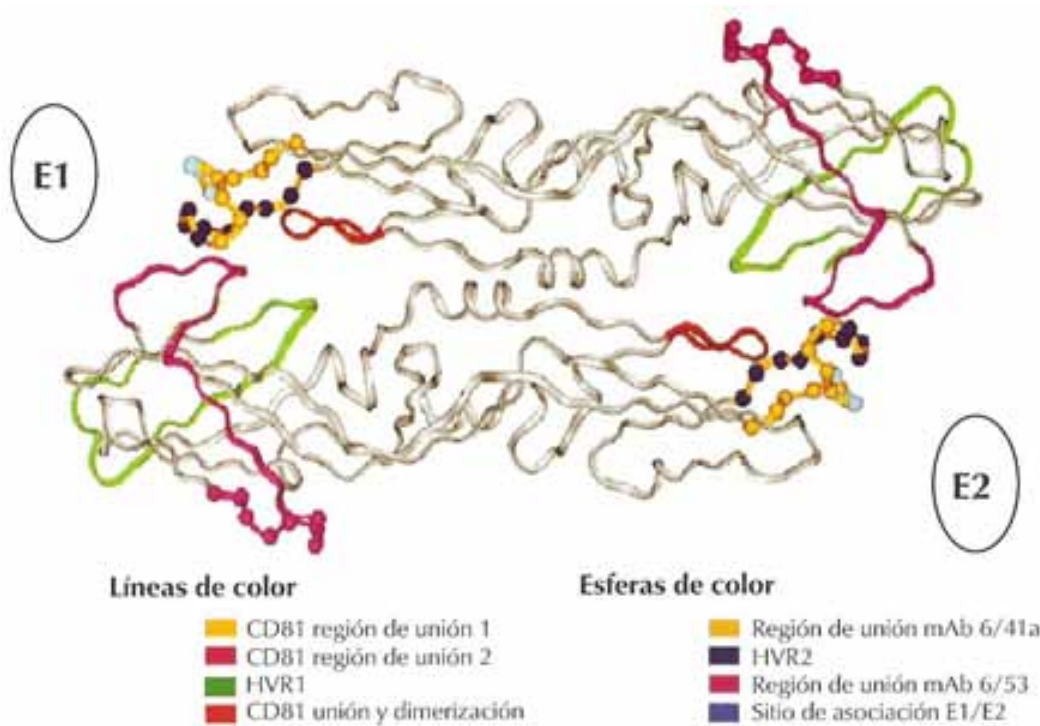


### b)Glicoproteínas E1 y E2

Las glicoproteínas E1 y E2 (*Envelope 1, Envelope 2*) se encuentran localizadas en la envoltura lipídica del VHC. Poseen numerosos sitios de glicosilación, lo que les permite jugar un papel fundamental en la unión a receptores de membrana, facilitando la entrada viral a la célula huésped. Son tan fundamentales en el mecanismo de entrada viral que se han considerado como blancos potenciales para futuras terapias antivirales.

La glicoproteína E2 tiene además la característica de contener una secuencia de aminoácidos conocida como “Región Hipervariable” o HVR, que permite los cambios en el material genético viral secundarios a mutaciones puntuales, lo que determina la selección de anticuerpos y el desarrollo de variantes virales que logren escapar de los mecanismos inmunes.

Tanto E1 como E2 desempeñan diversos roles en varios puntos del ciclo de vida del VHC. Ya se mencionó que son fundamentales para la entrada viral a la célula, pero también participan en el ensamblaje de las partículas virales infectantes, y permiten la unión del VHC con receptores como CD81, tetraspanina, SR-BI, heparán sulfato, DC-SIGN y L-SIGN (lectinas de unión a manosa), y lipoproteínas de baja densidad (LDL) (ver más adelante). Por encontrarse en la superficie viral, las proteínas de envoltura pueden ser atacadas por anticuerpos neutralizantes, lo que ha servido como base a diversos estudios. (Fig. 17)



**Figura 17.** Estructura molecular de las glicoproteínas E1 y E2. Se muestran sus sitios de unión a diversos receptores celulares, y se resaltan las Regiones Hipervariables (HVR) 1 y 2.

### c)P7 (NS1)

El polipéptido P7 se encuentra localizado en un sitio de la poliproteína original que se encuentra justo entre las proteínas estructurales y las no estructurales. Poco se sabe de esta proteína, pero se sospecha que desempeña su función en la integración de las estructuras de membrana, pero uno de los avances más grandes en el estudio de P7 es el descubrimiento de que este polipéptido es capaz de desempeñar una función de canal iónico en las membranas celulares, lo que podría facilitar aún más la entrada viral y aumentar la severidad del daño hepático, por lo que bloquear P7 también se ha convertido en una de las metas probables para futuros tratamientos.

#### d)NS2

La proteína no estructural 2 (NS2) es una parte integral de la membrana que no es esencial para la formación del complejo de replicación. Su verdadera función se desconoce, aunque se cree que interviene en la separación de las proteínas NS2/NS3, así como en la activación de NS3 una vez aislada.

#### e)NS3 y NS4A

El complejo NS3-4A conforma una proteína multifuncional que es esencial en la generación de componentes del complejo de replicación del RNA viral, además de bloquear la capacidad de la célula infectada para desarrollar una respuesta antiviral innata adecuada. Mediante su unión con diversas proteínas de la célula activa múltiples sistemas intracelulares, por lo que se ha propuesto como otro de los elementos que intervienen en la carcinogénesis del VHC.

#### f)NS4B

La proteína NS4B es un elemento no estructural altamente hidrofóbico, que induce alteraciones en las membranas intracelulares del huésped. Esto hace sospechar que una de sus funciones puede ser el inducir la formación de estructuras membranosas que brinden sostén a la replicación del RNA viral, además de funcionar como mecanismo de comunicación constante entre el lumen del retículo endoplásmico celular y el citosol donde se integran las cadenas de RNA.

#### g)NS5A

NS5A es una proteína asociada a la membrana del retículo endoplásmico de la célula infectada, lo que le brinda una función de “anclaje” viral, siendo así esencial para la replicación del genoma del VHC. Recientemente se ha descubierto que NS5A es el elemento viral que tiene el mayor papel en el desarrollo de resistencia viral al Interferón, mediante su interacción con diversos componentes de numerosas vías de señalización celular.

#### h)NS5B

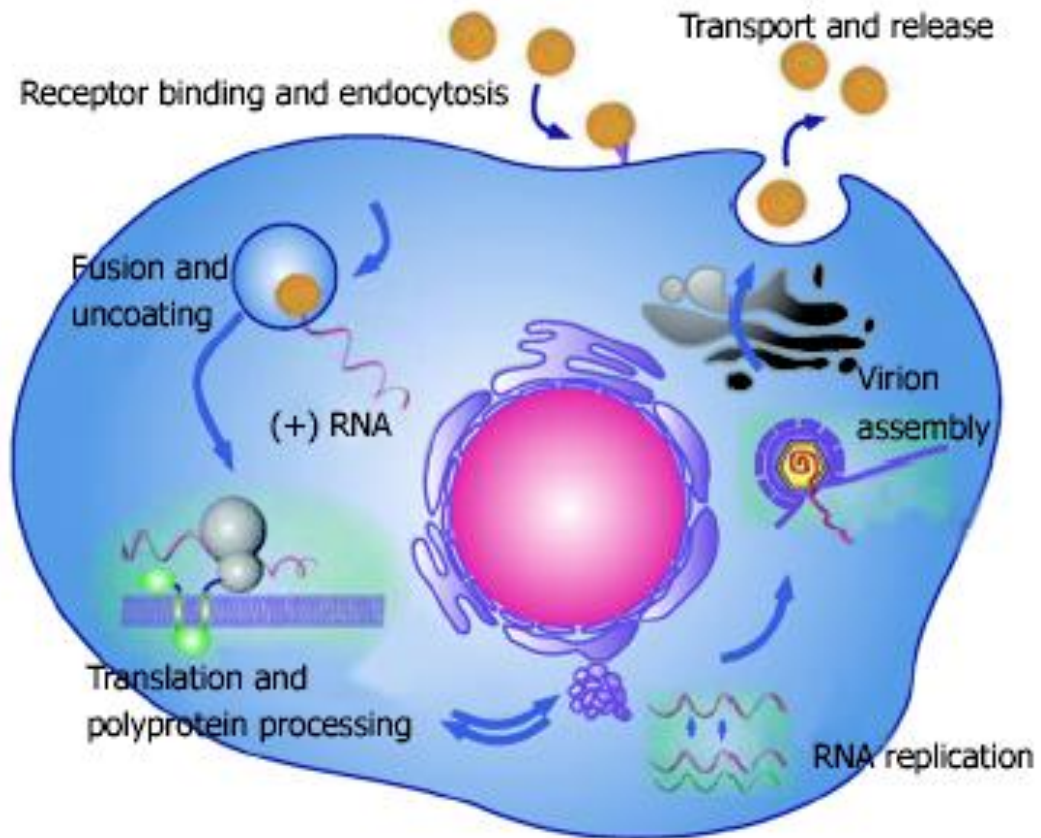
NS5B es una proteína con función de RNA-polimerasa, por lo que constituye el componente catalizador de la maquinaria de replicación del RNA de VHC. Esta enzima sintetiza nuevo RNA viral a partir de un molde de RNA previo, por lo que es capaz de iniciar la síntesis de RNA *de novo*, y su adecuado funcionamiento depende de la interacción con otras proteínas virales como NS3 y NS5A. Un dato interesante de este polipéptido es que se ha descubierto que la ciclofilina B (una proteína con actividad de isomerasa) interactúa con NS5B para estimular la formación de RNA de VHC. Por lo anterior, nuevos estudios están utilizando Ciclosporina A, que es un inhibidor de ciclofilina B, para lograr disminuir la replicación del VHC en cultivos celulares, hasta ahora con resultados alentadores.

## **2.-Ciclo de vida del VHC** (31,32)

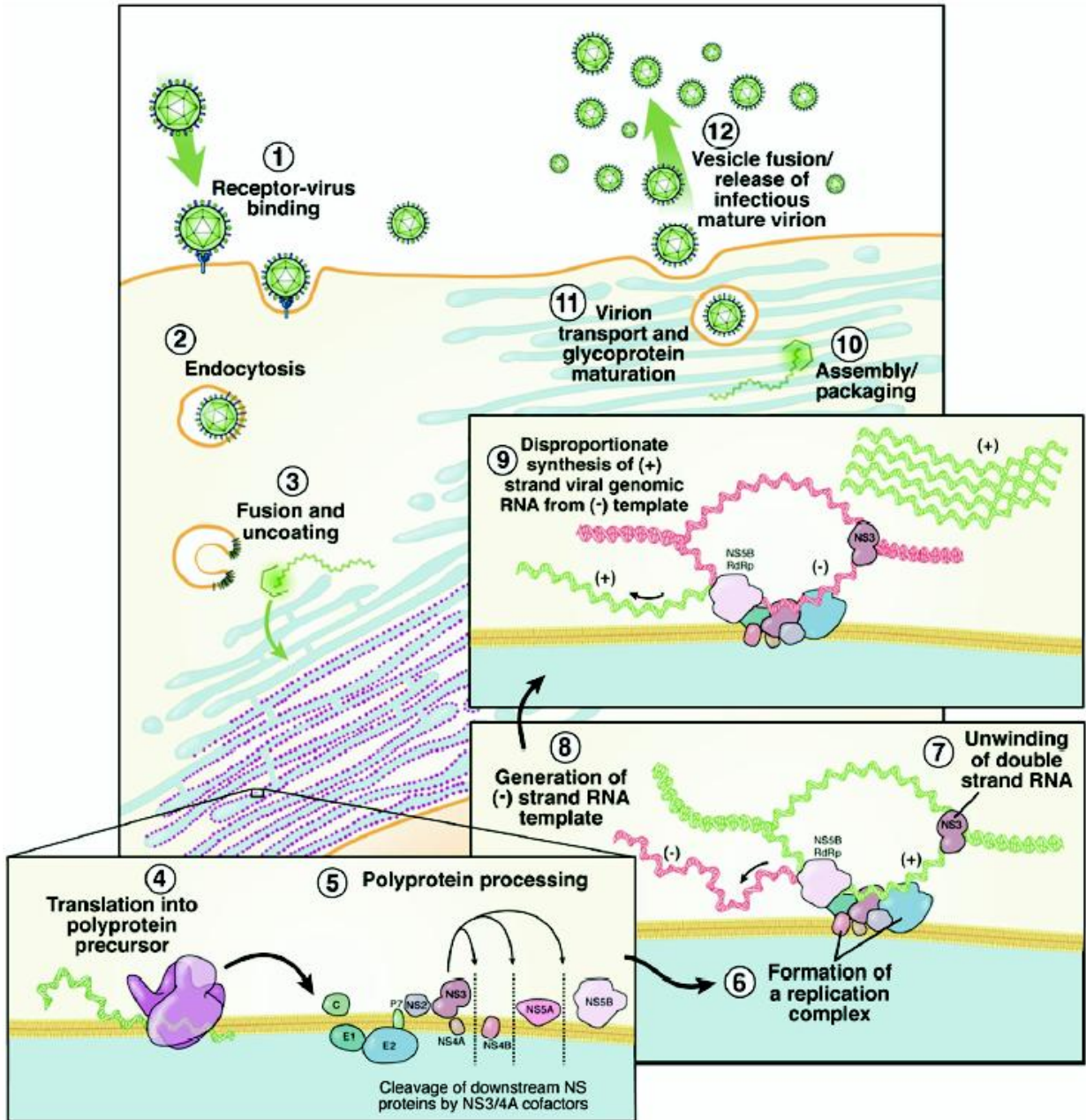
El ciclo de vida del VHC se muestra en forma esquemática en la figura 18. En resumen, el virión del VHC se une a un receptor de superficie celular (de los que se hablará más adelante), lo que lleva a la entrada viral por endocitosis. La fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal provoca la liberación del genoma del VHC en el citosol. El RNA de cadena sencilla es directamente traducido, y todas las proteínas virales son producidas de manera simultánea.

La expresión de las proteínas virales induce alteraciones en las membranas intracelulares que funcionan como base para la replicación del RNA de VHC, y posteriormente las proteínas no estructurales NS3 a NS5B se ensamblan en asociación con diversos factores celulares para formar un complejo de replicación, que es responsable de la formación de nuevo RNA.

La acumulación de RNA genómico viral y de proteínas estructurales estimula el ensamblaje de una nucleocápside, misma que adquiere una envoltura membranosa lipídica mientras aún se encuentra en el espacio intracelular. Finalmente, la nueva partícula viral es secretada de la célula por vías de transporte y liberación clásicas (exocitosis) (Fig. 19).



**Figura 18.** Representación esquemática de los principales momentos en el ciclo de vida del VHC (ver texto).

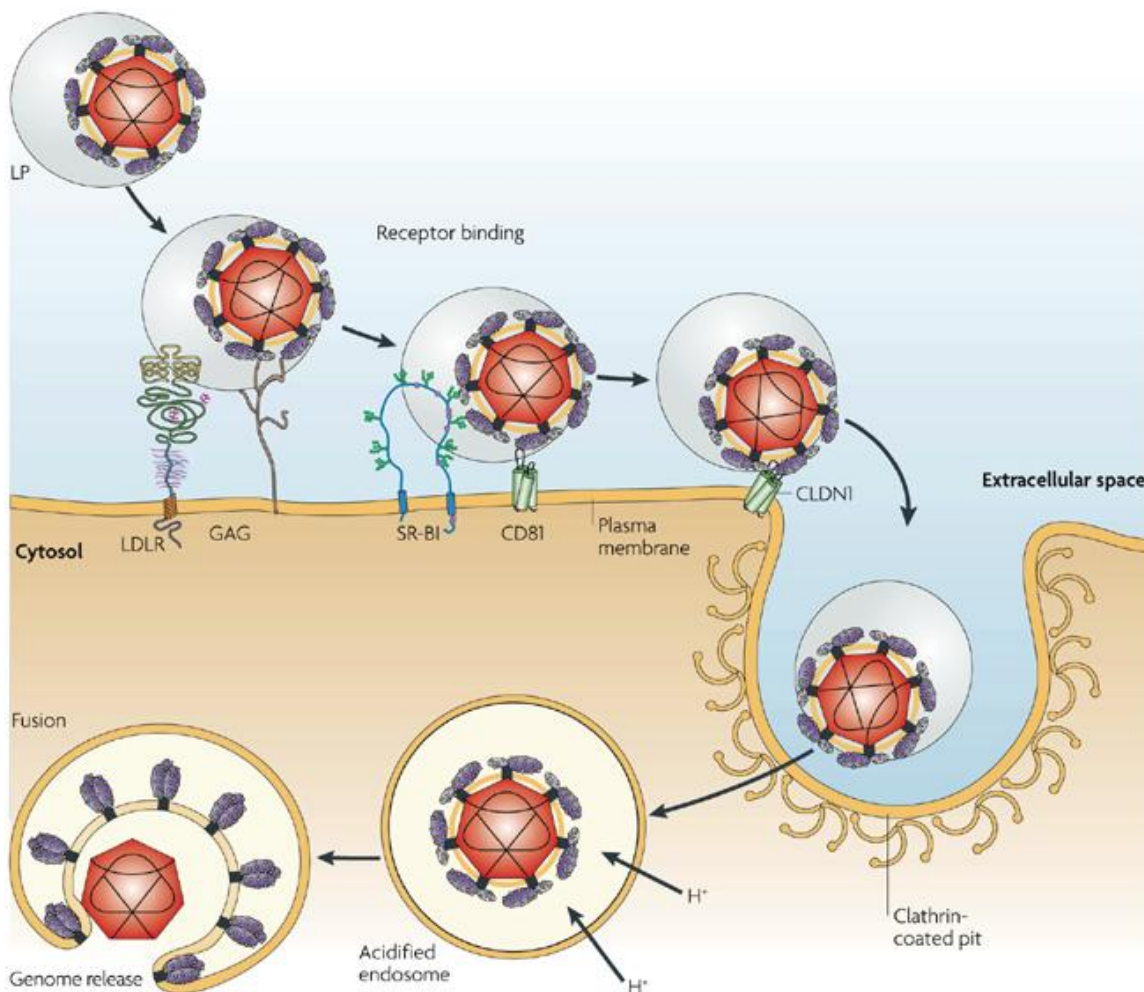


**Figura 19.** Representación detallada del ciclo de vida del VHC. Los números representan los pasos de la replicación viral que pueden funcionar como blanco para futuros fármacos antivirales.

**3.-Entrada del VHC a la célula** (33,35,36,37,38)

La infección de la célula huésped por el VHC comienza con la unión del virión a receptores de superficie de la membrana, lo que provoca endocitosis, fusión de la membrana viral con las membranas celulares internas para formar un endosoma, y liberación de la nucleocápside al citosol.

Como se mencionó previamente, las glicoproteínas de envoltura (principalmente E2) son consideradas las responsables de la unión del VHC a los receptores de membrana, de los cuales en la actualidad son tres los más estudiados: CD81, SR-BI y Claudina-1 (CLDN1), además de diversos glicosaminoglicanos de membrana (GAGs) y de los receptores para lipoproteínas de baja densidad (LDLr) (Fig. 20).





**Figura 20.** Esquema que muestra la unión de las proteínas de la envoltura viral con diversos receptores de membrana glicosilados (GAGs, LDLr, SR-BI, CD81 y CLDN1) permitiendo la entrada del VHC a la célula (ver texto).

-CD81: es sin duda el más estudiado de los receptores celulares del VHC. CD81 es parte del complejo de receptores de células B, aunque no es del todo esencial para la función inmune de tipo humoral. Se ha descubierto que la administración de anticuerpos Anti-CD81, principalmente contra su porción de asa larga (CD81LEL) inhibe en forma potente la infección por VHC en todos sus genotipos; de hecho, los niveles de CD81 en la superficie celular deben estar por arriba de un nivel mínimo para que la entrada viral a la célula se lleve a cabo en forma eficiente. La unión del VHC a los receptores CD81 de las células B se ha propuesto como una de las vías que provocan el desarrollo de manifestaciones extrahepáticas de la infección, como crioglobulinemia y LNH de células grandes tipo B.

-SR-BI (Scavenger Receptor class B, type I): SR-BI fue inicialmente considerado el principal receptor fisiológico para la entrada de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el hígado. En la actualidad, se ha descubierto que SR-BI constituye uno de los principales sitios de unión de la proteína viral E2, y que cuando se logra interferir en su expresión en la membrana del hepatocito se provoca una inhibición significativa de la infección por VHC. Se ha descrito también que el principal ligando de SR-BI, que son las HDL, aumenta de forma importante la entrada viral a la célula. Esto ha sugerido que SR-BI facilita la entrada de VHC al enriquecer con colesterol la membrana celular, y que la depleción en los niveles de colesterol pueden disminuir levemente la entrada viral.

-CLDN1,6,9 (Claudina-1, 6 y 9): CLDN1, que es una proteína de unión intercelular importante para el mantenimiento de la arquitectura histológica

hepática, recientemente ha mostrado ser esencial para la entrada del VHC a la célula. Así mismo, estudios realizados hace algunos años descubrieron que las moléculas relacionadas CLDN6 y CLDN9 también pueden ser utilizadas por el virus para facilitar su endocitosis. La expresión de CLDN1 confiere susceptibilidad celular a la infección por VHC aún en ausencia de CD81 y de SR-BI, lo que destaca su importante papel en este proceso. Al ser CLDN1 una proteína de unión intercelular, recientemente se ha descrito que el VHC puede utilizarla también para diseminarse directamente entre células adyacentes, lo que vuelve más veloz la expansión de la infección.

-Receptor de LDL (LDLr): el hallazgo de altos niveles séricos de partículas de VHC unidas a moléculas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), aunados a que el receptor de LDL (LDLr) funciona como la principal vía de entrada de estas moléculas al hígado, sugiere que LDLr está involucrado en la unión y captura viral en la membrana celular. Múltiples estudios reportan que los niveles séricos de LDL son menores en pacientes con infección crónica por VHC en comparación con controles sanos, lo que habla de una mayor interiorización de dichas moléculas al compartimento intracelular mediada por la actividad del VHC. Además, los pacientes infectados por VHC genotipo 3 (que son los que con más frecuencia se asocian a esteatosis hepática) han demostrado tener niveles séricos aún menores de LDL en comparación con otros genotipos, y se ha evidenciado que tras el tratamiento del VHC genotipo 3 los niveles séricos de LDL se incrementan en forma dramática, y la esteatosis desaparece –en ausencia de otras causas de la misma-, y existen autores que incluyen los niveles de LDL antes del tratamiento como un fuerte factor predictor de respuesta viral sostenida. Debido a lo anterior, se han llevado a cabo estudios con fármacos como Fluvastatina, tanto como monoterapia como en combinación con PEG-IFN y Ribavirina, buscando disminuir los niveles circulantes de VHC aunque aún sin resultados concluyentes.

-GAGs (Glicosaminoglicanos): Los glicosaminoglicanos son polisacáridos lineales que se encuentran presentes en proteínas de superficie celular de todo el cuerpo humano, y que han mostrado presentar interacción con diversas clases de virus, incluyendo el VHC. Se piensa que esta unión está mediada por la proteína E2, y que se da principalmente con GAGs altamente sulfatados, como el heparán sulfato. Esto ha llevado a desarrollar estudios donde se intenta administrar glicosidasas para bloquear la actividad de los GAGs, logrando reducir la infectividad del VHC.

Existen otras moléculas que han sido asociadas con la entrada del VHC a la célula. Entre ellas se encuentran DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercelular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*) y L-SIGN (*liver-specific intercelular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*). Aunque no funcionan como receptores directos de entrada viral, ambas han mostrado presentar alta afinidad para la proteína E2, y capturar viriones circulantes *in vivo*, facilitando su entrada a los hepatocitos.

## **C) ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS INDUCIDAS POR EL VHC**

Sin duda uno de los temas de mayor interés y que es en motivo de estudio en todo el mundo es la comprensión de los mecanismos que permiten que la infección por VHC sea capaz de desarrollar cronicidad en la mayoría de los pacientes. A diferencia del Virus de Hepatitis B (VHB), que al provocar infección en el adulto sólo progresa a cronicidad en 5 a 15% de los casos, el VHC logra escapar a los mecanismos de defensa y evoluciona a cronicidad hasta en 85% de los individuos infectados. Los diversos factores, tanto virales como del huésped, que contribuyen a la falla en la inmunidad y a la persistencia de la infección no han sido por completo dilucidados, pero se conocen ahora con mayor profundidad en comparación con estudios realizados hace algunos años. Las alteraciones en la inmunidad innata, humoral y celular provocadas por la infección se desarrollan a continuación.

### ***1.-Anticuerpos Neutralizantes en la Infección por VHC*** <sup>(39)</sup>

Ya se mencionó previamente que la depuración viral espontánea, tras la infección inicial, sólo se da en un 20 a 30% de los individuos, con lo que se logra una resolución completa sin riesgo de secuelas. En estos pacientes existen factores tanto virales como propios del huésped que permiten una adecuada resolución de la infección aguda. Las evidencias actuales indican que el principal papel en estos mecanismos iniciales de defensa lo juega una respuesta inmune celular fuerte, multiespecífica y de suficiente duración; pero gracias al desarrollo de nuevas técnicas de cultivo celular han permitido conocer más a fondo las vías de entrada viral y de la neutralización del VHC mediada por anticuerpos.

La replicación del VHC se ha demostrado no sólo en el tejido hepático (que constituye su órgano blanco principal) sino también en células hematopoyéticas, células dendríticas y linfocitos B, alterando su función. Una vez dentro de la célula infectada, las proteínas virales son reconocidas como ajenas por el sistema inmune del huésped gracias a la expresión de moléculas

del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) tipo I –Las moléculas del MHC-I [clasificadas con las letras A, B y C] tienen la función de presentar antígenos y proteínas que se encuentran en el medio intracelular a las células de defensa temprana, como las células NK, las células dendríticas y los linfocitos T CD8; mientras que las moléculas del MHC-II [clasificadas con las letras DP, DQ y DR] presentan antígenos que se encuentran en el exterior de la célula a los linfocitos T ayudadores [T helpers, Th]; en las infecciones virales como el VHC el papel principal lo desempeñan las moléculas MHC-I—.

Durante el curso natural de la infección por VHC se produce una gran cantidad de anticuerpos dirigidos a sitios antigénicos o “epítopes” tanto de las proteínas estructurales como no estructurales del virus. La gran mayoría de estos anticuerpos no cuentan con actividad antiviral, ya sea porque son rápidamente degradados, porque son constituidos en forma incompleta por proteínas provenientes de células en proceso de degradación, o simplemente porque están dirigidos a atacar epítopes que no desempeñan ningún papel en el proceso de entrada viral a la célula.

Sin embargo, existe una pequeña proporción de estos anticuerpos, denominados “anticuerpos neutralizantes”, que son capaces de atacar epítopes de las proteínas estructurales, logrando neutralizar los viriones infecciosos y controlando la entrada viral. Uno de los grandes problemas es que se sospecha que, *in vivo*, no se producen cantidades suficientes de estos anticuerpos neutralizantes como para lograr frenar la infección de manera efectiva, pero gracias al reciente éxito en la producción de partículas infectantes de VHC mediante el uso de clones celulares, se ha evidenciado que la infección por VHC puede ser neutralizada en forma eficiente por anticuerpos mono o policlonales dirigidos a epítopes de la envoltura viral. Este proceso logra bloquear directamente la unión del virus a la célula huésped, así como interferir en diversos momentos del ciclo de replicación del VHC.

No es de extrañar que las proteínas E1 y E2, que son críticas para la entrada viral a la célula, representen los principales blancos para buscar la neutralización viral por este medio. Nuevos anticuerpos en estudio dirigidos a E2, tanto policlonales como monoclonales, han probado ser capaces de inhibir la unión y la entrada celular del VHC, convirtiéndose en ejemplos prometedores de tratamientos en el futuro.

Aún queda mucho por descubrir acerca de los mecanismos de neutralización viral mediada por anticuerpos *in vivo*, así como de las vías que permiten el escape viral de estas respuestas humorales.

## **2.-Linfotropismo del VHC** <sup>(40)</sup>

El linfotropismo –afinidad por infectar células propias del tejido linfoide- del VHC representa un paso esencial en la patogénesis de los padecimientos autoinmunes y linfoproliferativos relacionados con el virus. La infección de células linfoides puede proveer un reservorio privilegiado para el VHC, capaz de interferir con la eficiencia del proceso de depuración de las defensas del huésped, y que puede estar implicado en la recurrencia viral posterior a un esquema de tratamiento antiviral aparentemente exitoso.

Un estado replicativo prolongado del virus en estos sitios extrahepáticos genera una respuesta inmunológica sistémica anormal, que en muchos casos puede manifestarse como hipocomplementemia (en sus etapas iniciales) y posteriormente con cuadros similares a vaculitis o linfoma. Además, dicho linfotropismo es responsable de la expansión poli-oligoclonal del virus, con la consecutiva producción de un amplio número de autoanticuerpos dirigidos a múltiples órganos, entre los que se incluyen el factor reumatoide (FR) las crioglobulinas y los complejos inmunes no crioprecipitables.

Ya se comentó que es la unión de la proteína E2 con el receptor CD81 la que permite la entrada viral a las células B, además de provocar alteraciones en la capacidad de modulación inmune celular y en la apoptosis, aumentando en forma importante la expansión clonal de las células B.

Debido a lo anterior Conca y cols <sup>(40)</sup> consideran que la detección, primero de hipocomplementemia, y después de crioglobulinemia mixta (que se sospecha en pacientes con elevación importante de inmunoglobulina M [IgM] en ausencia de otra causa aparente), puede utilizarse como marcador temprano de una linfoproliferación mediada por antígenos virales, anticipando un mala respuesta al tratamiento antiviral y un alto riesgo de recaída posterior al tratamiento. Aún más, la aparición de un LNH franco implica una pérdida total de la dependencia antigénica, y una falla en los sistemas inmunes celulares en pacientes con infección crónica por VHC.

Hasta la fecha no se cuenta con métodos confiables que permitan predecir qué pacientes con infección por VHC desarrollarán disfunción de las células B o crioglobulinemia mixta, aunque se ha observado que estos eventos tienden a estar relacionados con el tiempo de infección durante la historia natural del virus.

Esta nueva forma de “infección oculta” del VHC en el tejido linfoide ha cambiado por completo la forma de ver la enfermedad. Las respuestas virales medidas en suero pueden ya no ser suficientes para determinar una verdadera depuración viral sistémica posterior al tratamiento, y el resguardo del virus en las células B y otros tejidos hematopoyéticos pueden condicionar recidivas incluso en pacientes con una aparente buena respuesta a los fármacos antivirales. Por lo anterior puede ser de utilidad la recomendación de medir niveles de complemento y de inmunoglobulinas séricas a todos los pacientes antes de iniciar el tratamiento, con el fin de intentar detectar aquellos en quienes una invasión a los elementos linfoides ya está presente

(hipocomplementemia, IgM elevada) y que pueden tener un riesgo de baja respuesta a la administración de antivirales y de presentar recidiva viral post-tratamiento.



### **3.-Falla en la inmunidad celular en la infección por VHC** (41,42,48,58,59,60)

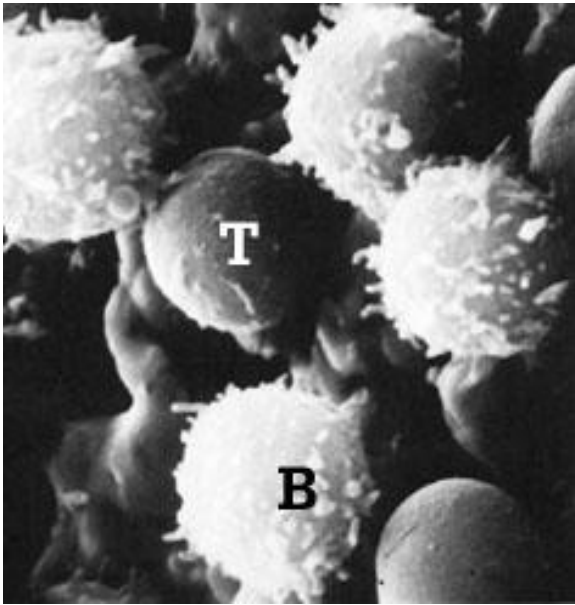
Los mecanismos de defensa celulares sufren alteraciones en diversos niveles en los casos de infección por VHC.

Las respuestas inmunes celulares, que involucran tanto a los linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL) como a los linfocitos T CD4+ “ayudadores”, desempeñan un rol esencial en el control de la infección por VHC, al igual que lo hacen con otras infecciones virales persistentes. A pesar de que tradicionalmente se ha considerado que las CTLs son las principales efectoras en la eliminación de las células infectadas por el VHC, en la actualidad es claro que las células T CD4+ específicas para VHC también juegan un importante papel.

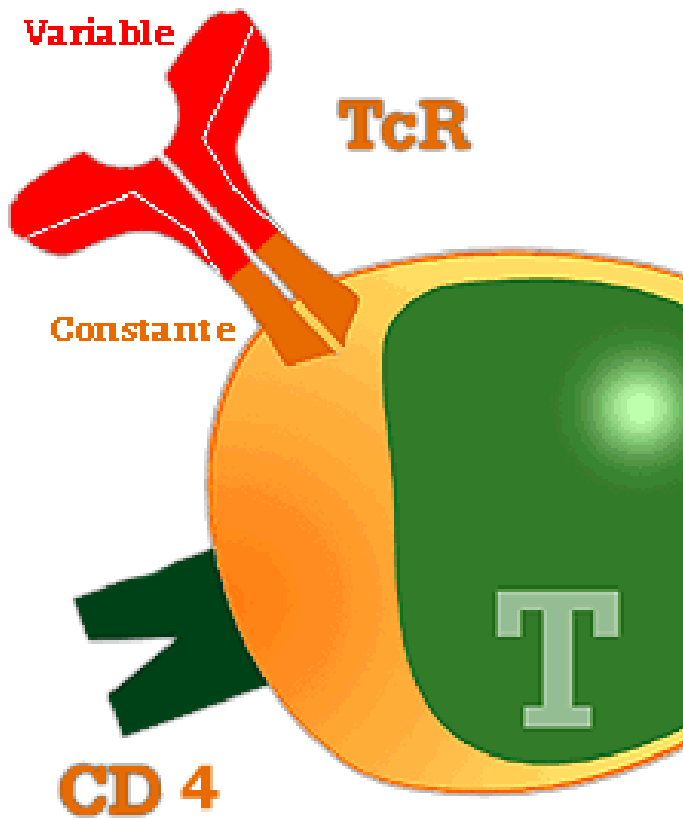
Los linfocitos T CD4+ habitualmente tienen un importante papel en el desarrollo de inmunidad de memoria a largo plazo contra diversos antígenos, y además pueden funcionar como “ayudadores” (helpers, Th) en el apoyo de la función de otras líneas celulares (Fig. 21, 22). Existe evidencia de que las respuestas tempranas que presentan las células T CD4+ ante la infección aguda por el VHC son fundamentales para el posterior desenvolvimiento del virus en el huésped, y en los casos que evolucionan a cronicidad se ha descrito que las líneas de CD4+ presentan respuestas antigénicas casi nulas o ausentes, mientras que en los individuos que no evolucionan a cronicidad –es decir, que han depurado el virus en forma espontánea— estas respuestas son vigorosas, multiespecíficas, y tienden a mantenerse activas durante largo tiempo.

Entre las funciones que se han descrito de las células CD4+ se encuentran la estimulación de las células CD8+ mediante la producción de Citocinas (inflamatorias o antiinflamatorias), la activación de las células presentadoras de antígenos (p.ej. células dendríticas), efectos antivirales directos, inducción

de la maduración de las células B, y funciones de regulación inmunológica de la que se hablará más adelante.



**Figura 21.** Microfotografía de un linfocito T rodeado por cuatro linfocitos B, vistos al microscopio electrónico de barrido.



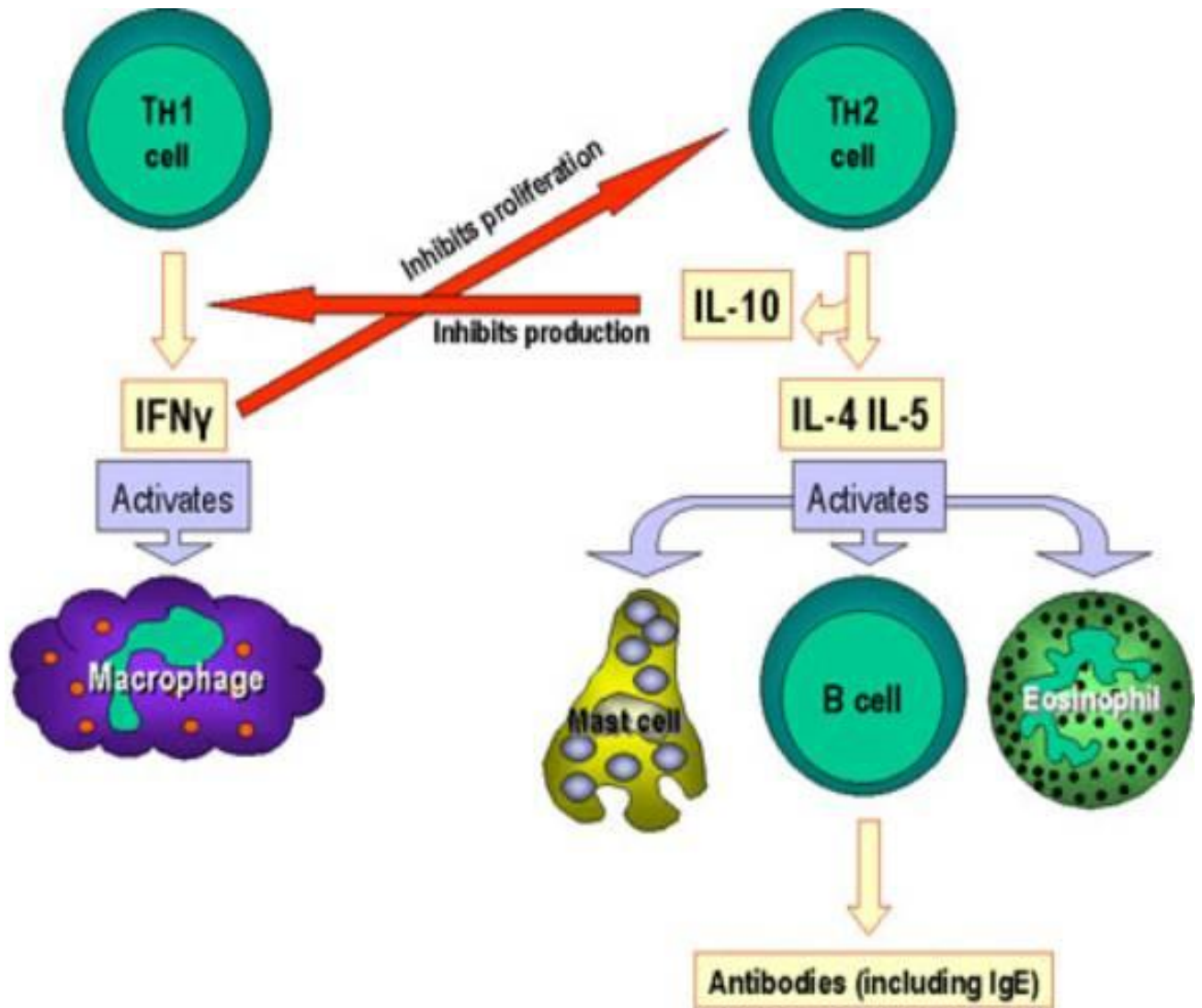
**Figura 22.** Esquema que representa un linfocito T CD4+, haciendo notar sus sitios de reconocimiento antigénico.

En este momento es importante destacar la importante función que tienen los linfocitos T CD4+ helpers (Th) en el inicio y regulación de la reacción inmune tanto celular como humoral. De acuerdo con el tipo de Citocinas y las respuestas que inducen, los linfocitos Th pueden subdividirse en Th1 y Th2. Las respuestas de tipo Th1 son activadas por la presentación de proteínas del MHC-I en la superficie de la célula identificada como anormal, y consisten en la producción de Interferón gamma (IFN-gamma), IL-2, IL-15 e IL-12, cuya función es activar las defensas de tipo celular, con los que elementos como las células Natural Killers (NKs), los linfocitos CD8+ y los macrófagos identifican las células dañadas (infectadas por virus o con transformación neoplásica) para destruirlas en forma directa.

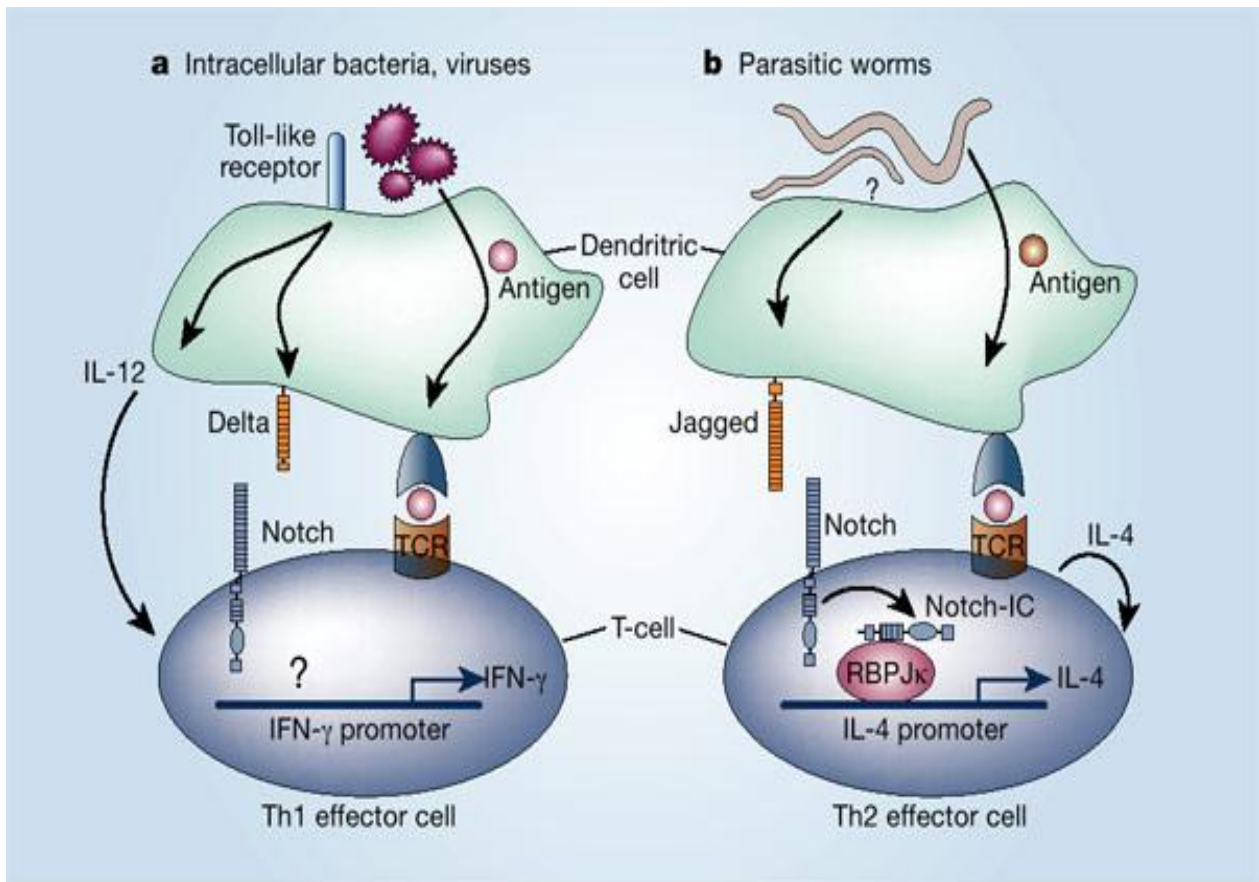
Las respuestas de tipo Th2 son iniciadas por estímulos provenientes de moléculas del MHC-II (bacterias, hongos no intracelulares, parásitos), y tienen como misión poner en marcha las defensas de tipo humoral. Una vez activados, los linfocitos CD4+ Th2 liberan Citocinas del tipo IL-4, IL-5 e IL-10, que además de inducir la producción de anticuerpos y de otros mediadores celulares de la inflamación por linfocitos B, plasmocitos, eosinófilos y mastocitos, bloquean de manera directa la actividad de las células Th1. Por el contrario, el IFN-gamma que es liberado por los CD4+ Th1 inhibe la proliferación de linfocitos Th2. Es decir, que ambas líneas inflamatorias son mutuamente excluyentes, por lo que encontrar ambas en plena actividad en una misma patología es sumamente raro (Fig. 23, 24, 25).

Ambos sistemas (Th1 y Th2) constituyen la llamada “inmunidad innata”, ya que son capaces de activarse en forma temprana justo al tener contacto con el antígeno invasor y desarrollar un ataque inmediato (por fagocitosis, citotoxicidad directa o anticuerpos opsonizantes) aún en ausencia de otros estímulos y sin necesidad de contar con memoria antigénica previa.

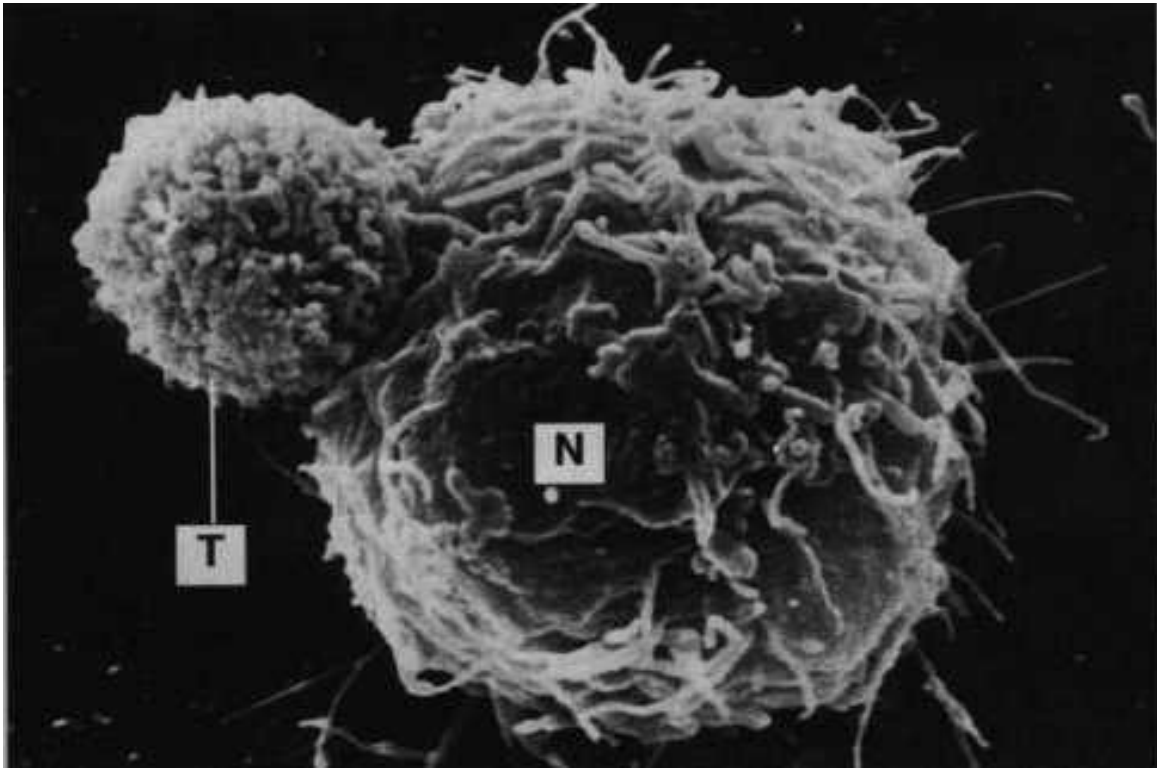
Todo lo anterior es importante porque, como se mencionó anteriormente, las defensas contra el VHC mediadas por anticuerpos (es decir, de tipo Th2) tienden a ser débiles e insuficientes, por la baja cantidad de virus circulando libremente. Así que la mayoría de los mecanismos de defensa con los que cuenta el organismo para depurar la infección son de tipo celular (Th1), mediados por células NK, macrófagos y linfocitos CD8+, que son activados a su vez por IFN-gamma, IL-2, IL-15 e IL-12. De ahí que gran parte de los estudios sobre el desarrollo de cronicidad en pacientes con infección por VHC presupongan, como uno de los elementos que permiten la persistencia viral, una falla en los sistemas innatos Th1.



**Figura 23.** Esquema de los mecanismos de activación de las vías celular y humoral por los linfocitos Th1 y Th1. Nótese las vías de mutua inhibición con que cuentan estos sistemas (flechas rojas).



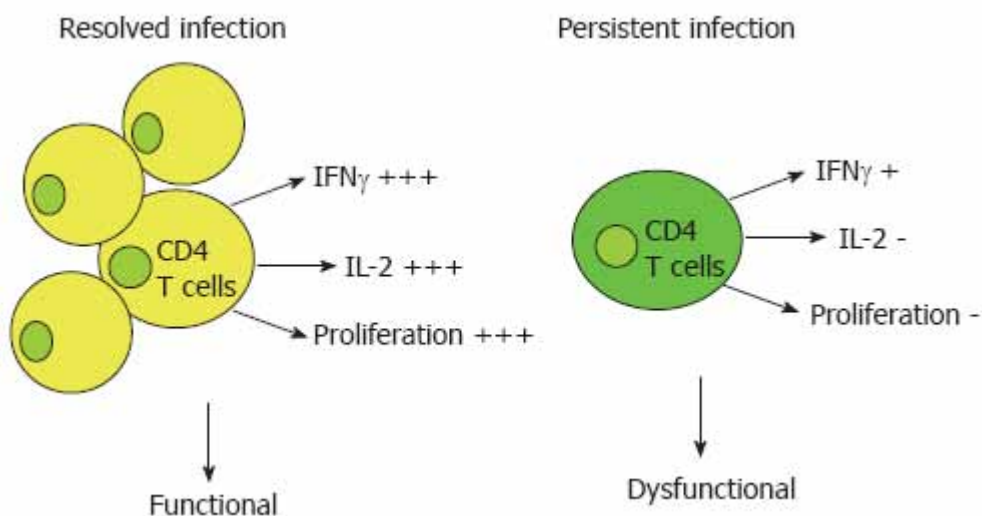
**Figura 24.** Esquema detallado de la activación molecular de los mecanismos Th1 y Th2. La vía Th1 (celular) es iniciada por moléculas del MHC-I (provenientes del interior de la célula dañada, como virus o transformación tumoral), mientras que la vía Th2 comienza por la presentación de moléculas del MHC-II (provenientes de antígenos externos a la célula, como parásitos o bacterias). Nótese el papel que juegan IL-12 e IF-gamma en la primera, así como IL-4 en la segunda.



**Figura 24.** Célula NK (N) destruyendo por citotoxicidad mediada por contacto directo una célula con transformación tumoral (T) después de ser activada por los sistemas Th1.

Sin embargo, aunque una respuesta CD4+ suficientemente vigorosa es indispensable tanto en la fase temprana como en la fase tardía de la infección por VHC para obtener un adecuado control del virus a largo plazo, se ha demostrado que ésta no es suficiente por sí sola, ya que en animales de estudio (chimpancés) se ha descrito que una activación CD4+/Th1 enérgica no necesariamente implica la depuración de la infección. Los estudios sugieren que en aquellos pacientes en quienes las respuestas tempranas de CD4+ no son iniciadas, o son tan pobres que no llegan a detectarse, el riesgo de desarrollar cronicidad es mucho mayor. Un segundo grupo de pacientes puede integrar una respuesta temprana de CD4+ Th1 rápida y potente, y tiene altas probabilidades de depurar la infección, aunque estos son los menos. El tercer grupo, más numeroso que los dos anteriores –quizá

representa a la mayoría de los pacientes- puede desarrollar una respuesta temprana de CD4+ que inicialmente parecería adecuada, pero que gradualmente se va debilitando hasta perderse, permitiendo nuevamente la replicación viral y la cronicidad. Para que la respuesta Th1 fuese suficiente, quizá bastaría con que estuviera dirigida a un mayor número de epítopes o desarrollara su actividad por un tiempo más largo, pero hasta el momento no se han logrado identificar los sitios clave sobre los que la respuesta antigénica contra el VHC debe desarrollarse, ni tampoco se conoce cuáles son las vías que permiten que esta respuesta dure un tiempo suficiente para eliminar la infección. Entre los componentes virales que podrían servir como sitios blanco para desarrollar una respuesta CD4+/Th1 suficientemente potente se encuentran NS3, NS4 y NS5A. De manera interesante, existen estudios que reportan que algunas respuestas inmunológicas mediadas por moléculas MHC-II (como HLA-DRB1\*0101, HLA-DRB1\*1101 y HLA-DQB1\*0301) pueden también intervenir en la erradicación del VHC, aunque el mecanismo exacto por el que lo hacen aún no ha sido determinado. La figura 25 resume el papel que posiblemente juegan los linfocitos T CD4+ en el desarrollo de una adecuada respuesta Th1, misma que interviene en la eliminación de las células infectadas.



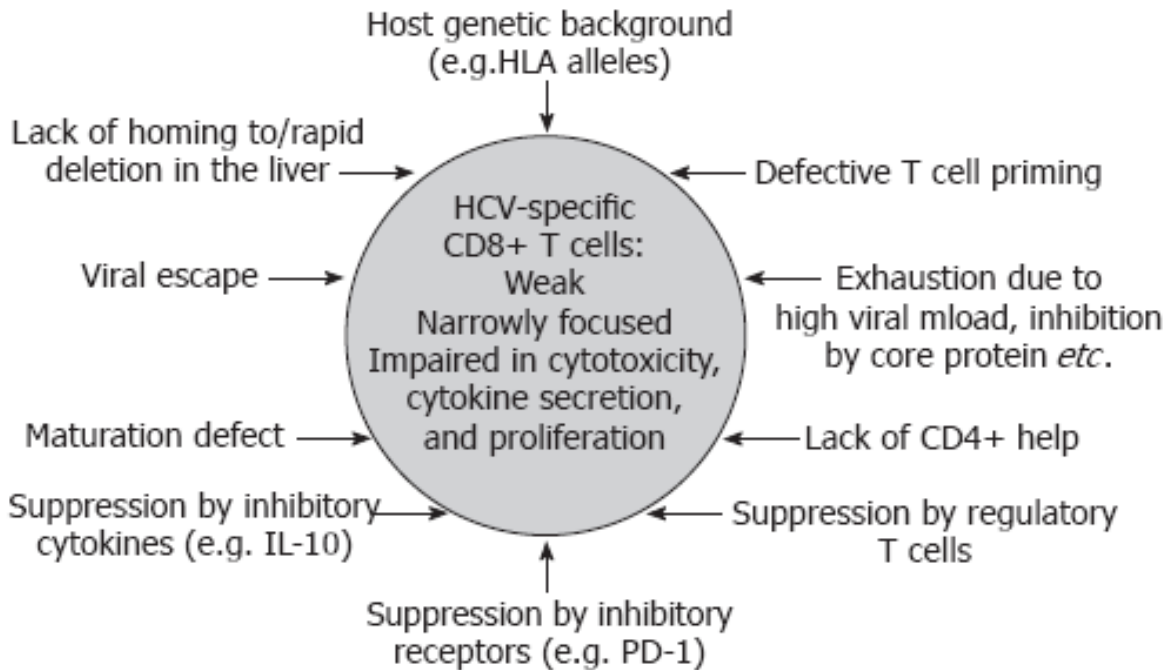


**Figura 25.** Se muestran las diferencias entre una activación funcional de linfocitos T CD4+ y una disfuncional, y los efectos que cada una tiene sobre la infección por VHC.

En cuanto a los linfocitos CD8+ citotóxicos específicos contra VHC, éstos son inicialmente activados por las vías Th1 de los CD4+ (ver arriba). Son considerados las células efectoras principales que intervienen en la reacción antiviral del huésped contra el VHC. Múltiples estudios han demostrado que una respuesta CD8+ suficientemente potente, dirigida a un amplio número de epítopes virales, se asocia de manera positiva con altos índices de éxito en la depuración viral, mientras que en los pacientes que desarrollan cronicidad las respuestas CD8+ son usualmente débiles, enfocadas a un número mínimo de epítopes o muestran defectos funcionales que debilitan su citotoxicidad, su capacidad de producción de Citocinas y su poder de proliferación.

Entre los factores de la infección por VHC que se han asociado tanto con una falla de CD8+ como con una actividad incompleta de CD4+ se encuentran mutaciones virales, supresión inmune por factores del virus, sobreproducción de Citocinas inhibitorias (como IL-10), ligandos inhibitorios, y actividad incrementada de células T reguladoras –de las que se hablará más adelante—. Además, otros factores como el perfil genético de cada paciente, la efectividad de sus sistemas de Antígeno Leucocitario Humano (HLA) y la adecuada presentación de las células presentadoras de antígenos también pueden intervenir en la reacción temprana y tardía del huésped contra el VHC. La literatura describe también dos alteraciones funcionales importantes de los linfocitos T CD8+ en pacientes con infección crónica por VHC: primero, una falla para activar en forma suficiente su actividad (falla primaria de CD8+); y segundo, un rápido agotamiento de las respuestas CD8+ a pesar de haber sido adecuadamente iniciadas (“extenuación de CD8+”) (Fig. 26).

Existe un receptor recientemente descrito, denominado PD-1 (del inglés *Programmed cell death 1*) que ha demostrado ser un marcador altamente sensible de extenuación de las respuestas CD8+ en infecciones virales crónicas. Su bloqueo mediante anticuerpos específicos podría restaurar la producción de Citocinas, la actividad citotóxica y la proliferación de las CD8+ extenuadas, aunque esto aún se encuentra en estudio.



**Figura 26.** Posibles causas de disfunción de la respuesta de linfocitos T CD8+ en pacientes con infección crónica por VHC (ver texto).

Entre las moléculas HLA pertenecientes al MHC-I que se han asociado con una rápida inducción de los sistemas Th1 y un adecuado mantenimiento de las respuestas tanto CD4+ como CD8+ se encuentran HLA-A3, HLA-Cw\*01 y HLA-B27, siendo curiosamente estos últimos alelos los que se asociaron con una mejor respuesta de depuración viral, sobre todo en mujeres jóvenes (80%), mientras que el perfil HLA-B8 ha sido asociado a persistencia viral y desarrollo de infección a largo plazo.

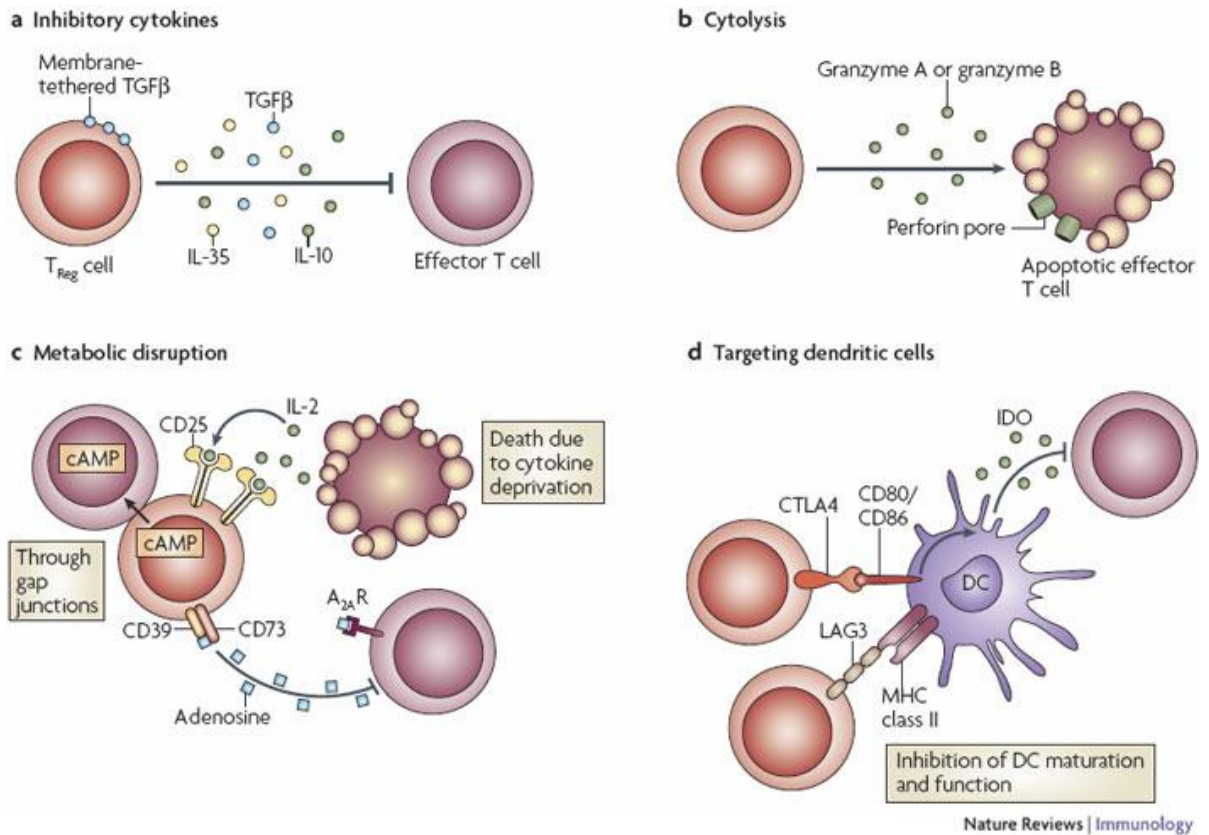
Otro grupo celular de interés en el desarrollo de cronicidad en pacientes con VHC son los linfocitos T reguladores (Treg). Estos pueden contribuir en la patogénesis y pronóstico de las infecciones virales al suprimir las respuestas inmunes antivirales. En realidad, su papel es desempeñado con un fin de protección al huésped, ya que se cree que disminuyen la respuesta inflamatoria para evitar una actividad de linfocitos T demasiado elevada que podría llevar a daño hepático extenso y falla hepática. Los linfocitos Treg llevan a cabo su función a través de cuatro vías:

a) Producción de Citocinas inhibitorias (como IL-10)

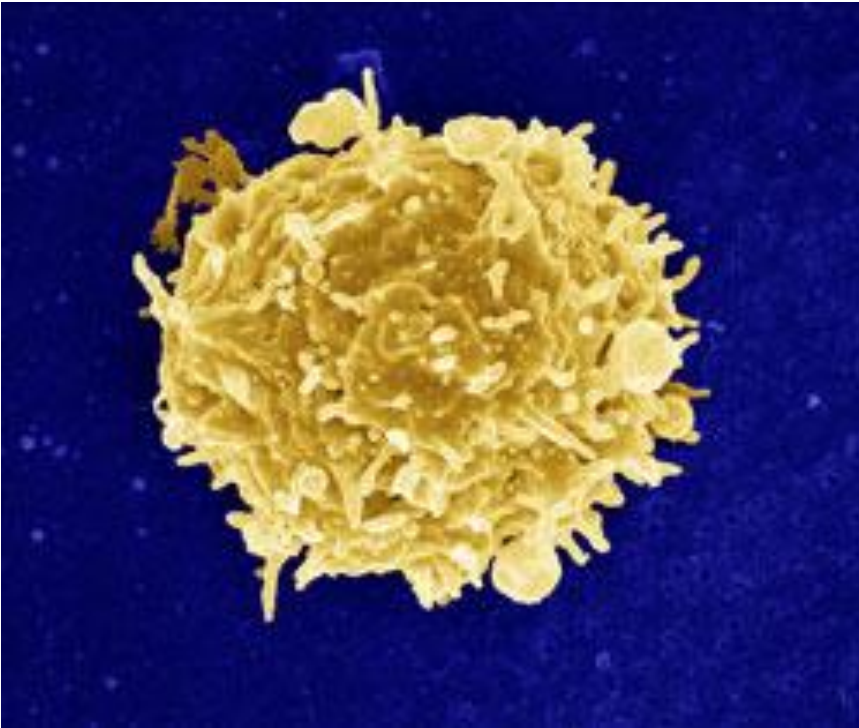
b) Citólisis directa de linfocitos T activados, tanto CD4+ como CD8+, mediada por perforinas y granzimas A y B

c) Inducción de apoptosis de linfocitos T mediante CD25+, AMP cíclico y adenosina

d) Bloqueo de receptores en la superficie de las células dendríticas, inhibiendo su proliferación, maduración y capacidad de reconocer y presentar antígenos a las células T efectoras (Fig. 27 y 28).



**Figura 27.** Esquema que muestra las cuatro vías por las que las células Treg son capaces de frenar la respuesta inmune (a: producción de Citocinas inhibitorias; b: citólisis de linfocitos T por perforinas y granzimas; c: inducción de apoptosis de células T por CD25+; d: bloque de células dendríticas) (ver texto).

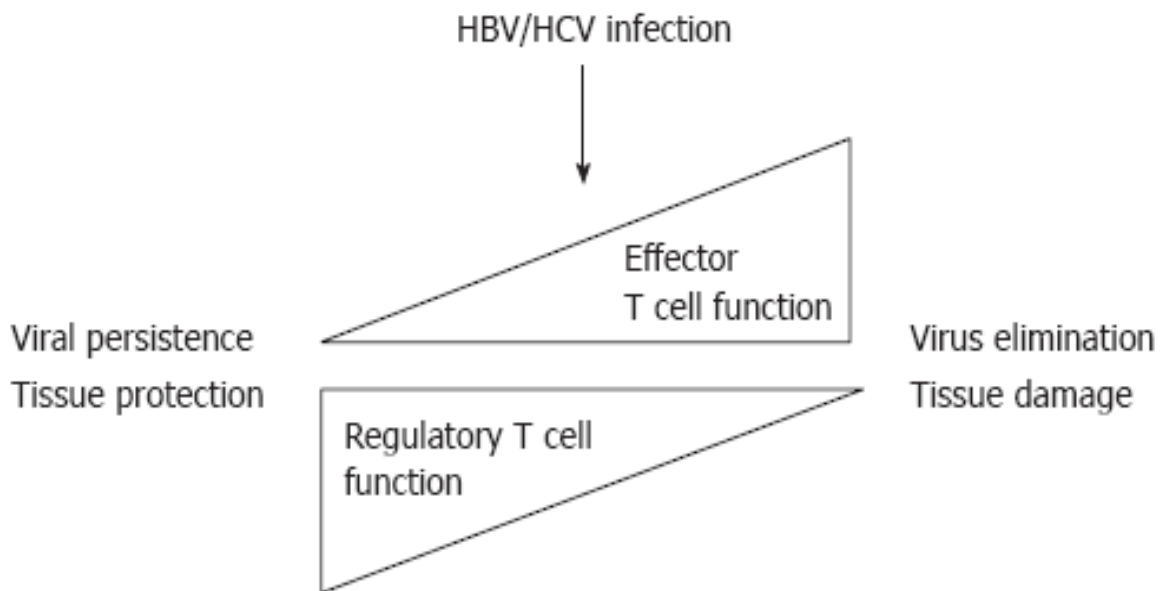


**Figura 28.** Microfotografía de un linfocito T regulador (Treg) visto al microscopio electrónico de barrido.

Entre las características de los Treg se encuentra la expresión de marcadores de membrana de tipo CD4+CD25+ (siendo este último un homólogo de la cadena alfa del receptor de IL-2), lo que les confiere varias de sus características antigénicas y permite su potencial de inhibición. Sólo alrededor de un 5 a 10% del total de las células T CD4+ de un ser humano son Treg naturales. El factor fundamental para estimular su producción y maduración es la proteína conocida como FoxP3, que es liberada por el timo, y que es el mejor marcador para la identificación de este grupo celular.

Las células Treg suprimen la proliferación de CD4+ y CD8+, disminuyen su producción de Citocinas (como IFN-gamma e IL-2) y alteran su capacidad citolítica, lo que altera sustancialmente su potencial para lisar células infectadas por VHC. Con esto, la actividad de las Treg ayuda a que se

establezca la persistencia viral, además de prevenir un daño excesivo de tipo autoinmune (Fig. 29).

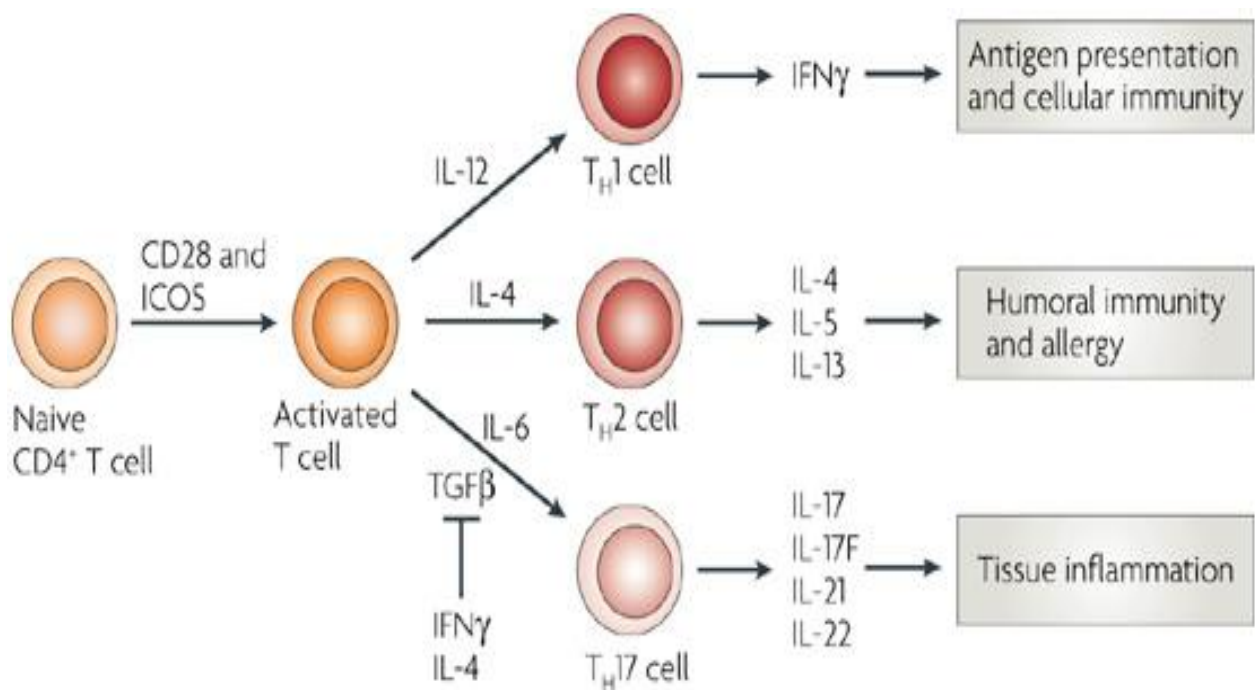


**Figura 29.** Diagrama que muestra la relación inversa que presenta la función de los linfocitos Treg con la actividad de los linfocitos T efector (CD4+, CD8+) y el efecto que este equilibrio tiene sobre la eliminación viral y el daño tisular por autoinmunidad.

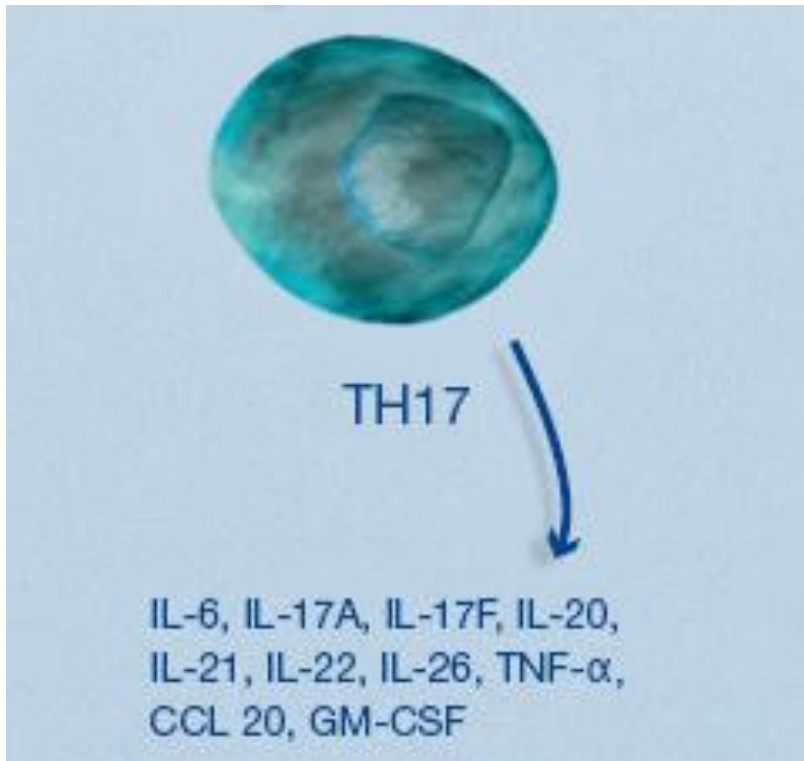
Aún no se sabe si el suprimir la actividad de los linfocitos Treg pueda servir como blanco para futuros tratamientos contra el VHC, ya que al desconocerse aún mucho sobre su función y mecanismos de control se puede permitir el desarrollo de un daño mayor a los órganos del huésped por mediación autoinmune, sin lograr realmente una mayor actividad antiviral de los mecanismos celulares de defensa.

Agregada a las anteriores, desde hace algunos años se ha descrito una nueva línea de linfocitos T con actividad proinflamatoria que no presenta marcadores de tipo CD4+, CD8+ o CD25+, y que tampoco es inhibida por la actividad de FoxP3, que han sido llamados linfocitos Th17 <sup>(49,50,51,52,53)</sup>, debido

a que su principal citocina liberada es la IL-17, con actividad similar a IL-12 e IL-15 y cierto mimetismo en su actividad con los sistemas Th1, presentando también asociación con la liberación de IFN-gamma. Además de IL-17, las Th17 pueden producir IL-20, IL-21, IL-22, IL-26 y TNF-alfa, según el medio donde se encuentren. Algunos autores como Rowan y cols <sup>(49)</sup> mencionan que en pacientes con infección crónica por VCH la producción tanto de IL-17 como de IFN-gamma puede ser inhibida por la proteína viral NS4, ya que ésta última ha mostrado tener la peculiaridad de inducir la producción de IL-10 y de Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF-beta), ambas con conocida actividad anti-Th1. Esto podría explicar una parte de las múltiples alteraciones inmunes provocadas por el VHC que permiten su evolución a cronicidad, aunque aún se requieren más estudios al respecto (Figs. 30 y 31).



**Figura 30.** Esquema que muestra la diferenciación de cada una de las tres líneas de linfocitos T efectoras (Th1, Th2, Th17) así como las funciones que desempeña cada una.



**Figura 31.** Modelo de un linfocito Th17, en el que se hace mención de algunas de las Citocinas proinflamatorias que produce una vez activado.



#### ***4.-Datos diversos sobre inmunidad y actividad inflamatoria en infección crónica por VHC***

Existen diversos estudios que demuestran que no sólo las vías humoral y celular ven afectada su actividad en pacientes con infección crónica por VHC. Múltiples alteraciones a nivel hormonal y molecular han sido observadas, algunas de las cuales se mencionan brevemente a continuación.

Se ha descrito que altas concentraciones de óxido nítrico (ON) son normalmente producidas por la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) que se encuentra en macrófagos, células de Kupffer y hepatocitos. Según Lake-Bakaar y cols<sup>(43)</sup>, en estas células se puede esperar una sobreinducción de la iNOS en pacientes que cursan con un proceso inflamatorio hepático asociado a la infección crónica por VHC, lo que podría verse reflejado con la detección de altos niveles séricos de NO, y que se traduciría en un alto consumo hepático de arginina (principal sustrato para la producción de NO) y en un mayor daño hepático ocasionado por radicales libres de oxígeno derivados de esta molécula. Basados en lo anterior, Izzo y cols<sup>(65)</sup> realizaron un estudio administrando deaminasa de arginina PEGilada a pacientes con infección crónica por VHC, logrando disminuir la carga viral hasta en 50% de los pacientes, aunada a una importante reducción en los niveles séricos de arginina y NO, lo que además mejoró la función hepática de manera global. Sin embargo, sus hallazgos no han sido respaldados por estudios similares.

Por otro lado, en los pacientes infectados por VHC se ha encontrado que la resistencia a la insulina y la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) son más prevalentes en comparación con controles sanos o en pacientes con infección por VHB<sup>(44)</sup>, esto probablemente debido a la liberación aumentada de Citocinas proinflamatorias como TNF-alfa<sup>(45,46,47,67)</sup>. Además, de los seis genotipos de VHC, Machado y cols han descrito que el genotipo 3 – principalmente 3a— tiene un potencial esteatogénico directo mucho mayor

en comparación con el resto, lo que parece estar asociado a cambios intrínsecos en el metabolismo hepático de las grasas, además de presentar una relación directamente proporcional con la carga viral <sup>(44)</sup>.

El Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1 (*Insulin-Like Growth Factor-1*, IGF-1) también desempeña un importante papel en la infección crónica por VHC. Este péptido ha demostrado elevarse en procesos inflamatorios crónicos del hígado, sobre todo en presencia de resistencia a la insulina, y de acuerdo con Strickler y cols<sup>(66)</sup> el IGF-1 estimula la proliferación y transformación de las células estelares hepáticas, aumentando su producción de colágeno y acelerando el proceso de fibrosis y cirrosis sobre todo en pacientes VHC+ con hiperinsulinemia.

De este modo, en pacientes con infección crónica por VHC, la presencia de un estado inflamatorio crónico persistente debería asociarse con niveles séricos elevados tanto de NO como de insulina, aunque no existen reportes comparativos al respecto.

El VHC también puede provocar cambios en la secreción de hormona del crecimiento (GH). Ursula Plöckinger y cols<sup>(61)</sup> realizaron un estudio con 21 pacientes con infección crónica por VHC para verificar los cambios en la función pituitaria, antes y después del tratamiento antiviral. Ellos observaron que antes de iniciar el tratamiento el 81% de los pacientes mostraban una insuficiencia severa de GH, y que durante y posterior al tratamiento estos niveles, tanto basales como estimulados, se incrementaron en forma significativa. También durante el tratamiento otras hormonas mostraron cambios, tales como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) cuyos niveles aumentaron significativamente durante el tratamiento, aunque la prolactina (PRL) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) no mostraron cambios, contrario a lo reportado en otros estudios. La conclusión que este grupo

brinda es que la insuficiencia de GH es frecuente en los pacientes con infección por VHC crónica, aunque dicha insuficiencia mejora significativamente con el tratamiento antiviral. Llama la atención que en este estudio también se reportan los niveles de IGF-1 los que, contrario a lo reportado por Strickler y cols<sup>(66)</sup> se encontraban disminuidos tanto antes como durante el tratamiento, lo que se puede traducir como una resistencia persistente de los hepatocitos a la GH aún después del tratamiento.

Otra repercusión de la infección por VHC digna de mencionar es la alteración en la regulación de los mecanismos de apoptosis de las células infectadas<sup>(62)</sup>. Es bien conocido el papel que juega la apoptosis en el control y eliminación de las infecciones virales, pero en los pacientes VHC+ estos mecanismos podrían resultar en dos efectos totalmente contradictorios: lograr un papel esencial en la eliminación de las células infectadas por VHC, sobre todo en presencia de IFN (tanto exógeno como inducido), o bien provocar un daño aún más extenso al desencadenar los procesos de fibrosis hepática. Virtualmente todas las proteínas del VHC tienen propiedades tanto pro- como anti-apoptóticas, siendo las más estudiadas NS5A y la proteína Core. El mismo RNA viral, al unirse a las moléculas intracelulares del huésped, puede modular o inducir directamente un proceso de muerte celular, principalmente con la activación de proteínas como la Protein-quinasa R (PKR), aunado a otros sistemas de inducción de apoptosis como la vía de las Caspasas, los receptores Fas/CD95, el daño por granzimas y perforinas y las cadenas TRAIL. El intentar regular la apoptosis inducida por el VHC en pacientes infectados se ha propuesto como una probable terapia futura en el tratamiento de la infección, ya que en modelos animales la inhibición de la apoptosis logró disminuir el proceso de fibrogénesis, además de que es bien conocido que una apoptosis excesiva puede provocar hepatitis fulminante. Pero frenar la apoptosis no ha demostrado lograr disminuir la carga viral o tener un efecto terapéutico real, por lo que también queda como propuesta aún en investigación.

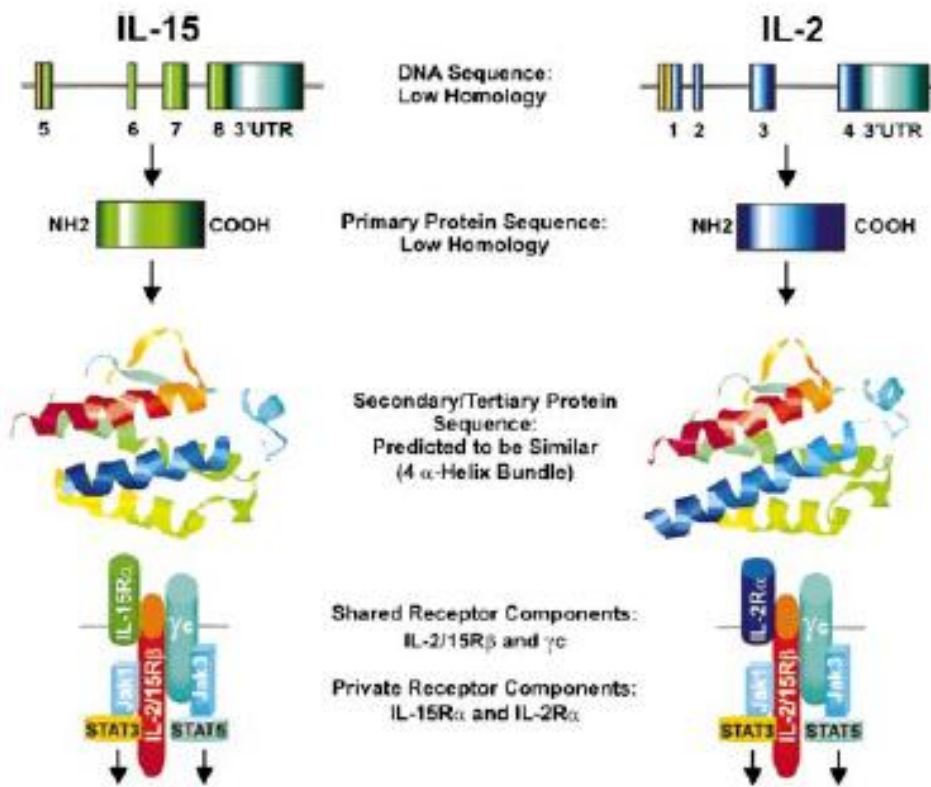
Finalmente, la interacción del VHC con el sistema de IFN, sobre todo con los de tipo I, es compleja<sup>(63,64)</sup>. En general, el sistema de interferones se divide en dos grupos: los IFN del tipo I (IFN-alfa e IFN-beta) y los IFN del tipo II (cuyo principal representante es IFN-gamma, del cuál se habló ampliamente arriba). En cuanto a los IFN tipo I, todas las células nucleadas del cuerpo humano son capaces de sintetizarlos y secretarlos en respuesta a una infección viral. Los IFN secretados son reconocidos por las células vecinas y provocan la expresión de potentes proteínas antivirales. Las células dendríticas son las principales productoras de IFN, y se cree que el RNA del VHC es el principal estímulo inductor de la liberación de Citocinas que llevan a la activación del sistema IFN. Sin embargo, el virus contiene elementos que le permiten escapar de la acción de los IFN, como NS5A, que como se dijo juega el rol más importante en el desarrollo de la resistencia viral a los IFN, además de inducir la liberación de IL-8, citocina que inhibe directamente la actividad antiviral de los IFN. De hecho, se han detectado niveles elevados de IL-8 en el suero de pacientes con infección crónica por VHC no respondedores a tratamiento con IFN. También NS3/4A interactúa directamente con los sistemas de producción de IFN, inhibiéndolos o restándoles potencia, por lo que una nueva clase de fármacos en investigación, los inhibidores de NS3 (como VX-950 y SCH6), podrían ser de utilidad en el futuro no solo al bloquear la expresión del VHC, sino también al evitar que el complejo NS3/4A interfiera con la producción de IFN alfa y beta. Como en el resto de los estudios, la relación completa del VHC con los sistemas de señalización y producción de IFN tipo I (y también tipo II) no se conocen por completo, por lo que se espera más información en el futuro.

### ***5.-Papel que desempeña la IL-15 en los padecimientos hepáticos***

La interleucina 15 (IL-15) fue descrita por primera vez en 1994 por dos grupos simultáneos de investigación: el de Burton y cols<sup>(68)</sup> y el de Grabstein y cols<sup>(69)</sup> como un factor que estimula la proliferación de líneas de células T, y que era producido tanto por células dendríticas como por linfocitos CD4+. Desde el

principio llamó la atención su similitud molecular con IL-2, con la que comparte afinidad por la subunidad beta de su receptor.

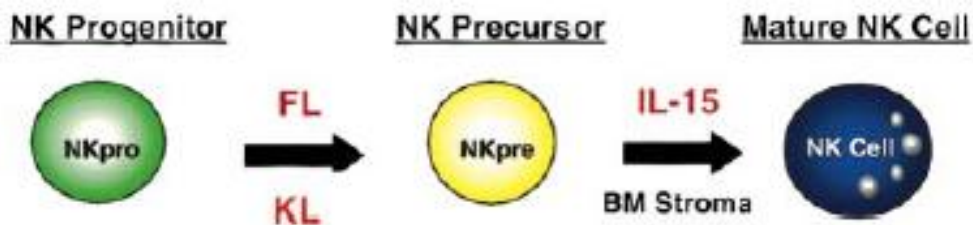
El gen codificador de la IL-15 se encuentra localizado en el cromosoma 4q31, y su receptor consta de tres elementos: una subunidad alfa que le es propia, una subunidad beta que comparte con la IL-2, y una subunidad gamma que es común a varias citocinas (70). Debido a que sus receptores celulares comparten elementos tanto con la IL-2 como con otras citocinas (75)(Fig. 32) la medición de niveles de IL-15 en medios tisulares no es práctica por su baja sensibilidad y especificidad, por lo que la cuantificación sérica de esta citocina es, hasta el momento, la prueba de elección según muy diversas publicaciones (68,69,70,71,72,73).



**Figura 32.** Similitud molecular entre IL-15 e IL-2. El diagrama muestra cómo aunque en su secuencia genética y en su estructura primaria la homología entre ambas citocinas es pobre, al alcanzar ambas su estructura terciaria la similitud se vuelve importante. En la parte inferior se muestran los receptores celulares de ambas interleucinas, donde se aprecia su alta

homología molecular y la forma en que comparten dos de tres subunidades, lo que vuelve poco práctica su cuantificación tisular.

Con el paso de los años la IL-15 ha demostrado tener un importante papel en la activación de la inmunidad celular innata por vías Th1, ya que estimula en forma directa la actividad de macrófagos, neutrófilos, linfocitos CD8+, y la maduración de células NK <sup>(75)</sup>(Fig. 33). Además, interviene en la regulación de la inmunidad adquirida mediante la estimulación de la proliferación de linfocitos tanto T como B previamente sensibilizados por antígenos, y su sobreexpresión o disregulación se considera elemento clave en enfermedades como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad celiaca, pancreatitis aguda, psoriasis, mieloma múltiple, enfermedad de Behcet o sarcoidosis <sup>(70,72,73,74)</sup>.



**Figura 33.** Esquema que muestra la forma en que la IL-15 interviene en el proceso de maduración de las células NK.

En cuanto al papel de la IL-15 en enfermedades hepáticas resultados muy variados, e incluso contradictorios, han sido publicados por diversos autores. En la mayoría de los estudios realizados en ratones de laboratorio los niveles elevados de esta citocina se tradujeron en daño hepático extenso, y en pacientes con falla hepática aguda, Yonekawa y cols reportan que los niveles elevados de IL-15 se asociaron con mal pronóstico y pobre respuesta a tratamiento <sup>(76)</sup>.

Al estudiar el efecto de IL-15 en la regeneración hepática, Suzuki y cols encontraron que la actividad apoptótica se veía inhibida, incrementándose la proliferación y diferenciación celular y promoviendo la regeneración

hepática, funcionando a través de una respuesta benéfica de tipo regulador (77).

En la infección crónica por VHC, Yamaji y cols (78) encontraron que el tratamiento con IFN tipo I (alfa y beta) aumenta de forma significativa la producción de IL-15 por células dendríticas, lo que a su vez estimula la maduración de células NK y linfocitos T CD8+ y eleva la producción de INF-gamma. Todo esto resulta en una mejor actividad antiviral, un mayor reconocimiento de las células hepáticas infectadas por el virus, y mejores probabilidades de depurar el VHC.

Lo anterior nos lleva a la conclusión de que en pacientes con infección por VHC la IL-15 puede ser determinante, ya que su adecuada producción es capaz de inducir una respuesta inmune innata con intensidad suficiente para limitar o incluso depurar el virus. Por el contrario, niveles séricos indetectables de IL-15 pueden traducirse en una respuesta Th1 insuficiente, una inmunidad celular defectuosa, y finalmente en la persistencia viral en el huésped con evolución a cronicidad del VHC (79,80,81,82). Sin embargo, no hay aún suficientes estudios publicados que correlacionen los niveles de IL-15 con otros factores que también pueden determinar cronicidad de la infección, por lo que el verdadero papel que juega esta citocina ante la falla de eliminación del VHC continúa en estudio.

### III.-DEFINICIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La inmunidad innata es fundamental para limitar las infecciones virales a nivel hepático, principalmente durante la fase aguda, debido a su alta capacidad de destruir células blanco inclusive en ausencia de anticuerpos específicos o de estimulación antigénica, siendo por esto la primera y más rápida línea de defensa corporal ante una agresión viral. El adecuado funcionamiento y atracción de diversas líneas celulares hacia los sitios de infección se encuentra dado a través de citocinas proinflamatorias específicas, entre las cuales destacan IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, gracias a las cuales las células NK y los linfocitos T CD8+ son activados, induciendo así la producción de interferones endógenos por parte de las mismas (principalmente INF- $\gamma$ ), promoviendo la destrucción de la célula infectada tanto por vía humoral y celular como por inducción de apoptosis, con lo que queda limitado el riesgo de progresión de la infección.

Sin embargo, se cuenta con evidencia de que el VHC interfiere de modo directo con la respuesta inmune del huésped, provocando supresión de linfocitos T citotóxicos y disminución en la producción de IFN- $\gamma$ , IL-15 e IL-2, lo que sugiere dos teorías: que las proteínas del VHC no logran desencadenar una respuesta inflamatoria adecuada gracias a un mimetismo molecular que las protege de ser detectadas por el sistema inmune innato del huésped, ó que los huéspedes que desarrollan infección crónica tienen una deficiencia intrínseca en la producción de Interleucinas proinflamatorias de causa no conocida, que los vuelve más susceptibles a desarrollar cronicidad por la infección. Ninguna de ambas teorías ha sido probada.

Por otro lado, se ha descrito que altas concentraciones de óxido nítrico (NO) son normalmente producidos por la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) que se encuentra en macrófagos, células de Kupffer y hepatocitos. En



estas células, se puede esperar una sobreinducción de la iNOS en pacientes que cursan con un proceso inflamatorio hepático asociado a la infección crónica por VHC, lo que podría verse reflejado con la detección de altos niveles séricos de NO. Finalmente, en los pacientes infectados por VHC se ha encontrado que la resistencia a la insulina y la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) son más prevalentes en comparación con controles sanos o en pacientes con infección por VHB, esto probablemente debido a la liberación aumentada de Citocinas proinflamatorias como TNF-alfa.

De este modo, en pacientes con infección crónica por VHC, la presencia de un estado inflamatorio crónico persistente debería asociarse con niveles séricos elevados de NO e insulina, además de que, en teoría, se podrían encontrar niveles séricos disminuidos de interleucinas proinflamatorias del tipo Th1 (como la IL-15) que traducen disfunción de las líneas de defensa celular, indispensables para limitar las infecciones virales intracelulares.

A pesar de que existen estudios que han descrito en forma aislada los niveles séricos tanto de IL-15 como de NO y de insulina en pacientes con infección por VHC, ninguno ha buscado correlacionar las tres variables en forma simultánea, lo que hace de éste un posible estudio piloto a partir del cual se puede extender el campo de investigación.

Con todo lo antes dicho, nuestro planteamiento del problema es el siguiente: ¿Los niveles séricos de IL-15, de NO y de Insulina muestran relación entre sí en pacientes con infección crónica por VHC?

## IV.-OBJETIVOS

### ***Objetivo general***

Comparar los niveles séricos de IL-15, de NO y de insulina en pacientes con infección crónica por VHC.

### ***Objetivos específicos***

-Determinar los niveles séricos de IL-15, NO e insulina en un grupo de pacientes con infección crónica por VHC

-Conocer si los niveles séricos de IL-15 se relacionan con los niveles séricos de NO en pacientes con infección crónica por VHC

-Conocer si los niveles séricos de IL-15 se relacionan con los niveles séricos de insulina en pacientes con infección crónica por VHC

## V.-HIPÓTESIS

### ***HIPOTESIS NULA***

Los niveles séricos de IL-15 no muestran relación con los niveles séricos de NO en pacientes con infección crónica por VHC

Los niveles séricos de IL-15 no muestran relación con los niveles séricos de insulina en pacientes con infección crónica por VHC

### ***HIPÓTESIS ALTERNA***

Existe una relación entre los niveles séricos de IL-15 y de NO en pacientes con infección crónica por VHC

Existe una relación entre los niveles séricos de IL-15 y de insulina en pacientes con infección crónica por VHC

## VI.-MATERIAL Y MÉTODOS

### ***1.-Diseño del Estudio***

Se llevó a cabo un estudio prospectivo, observacional, transversal, abierto, clínico, comparativo y aplicado durante el periodo de marzo a junio de 2009, en la población de pacientes infectados por VHC en el Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos del ISSSTE aceptados para protocolo de tratamiento antiviral con PEG-IFN  $\alpha$ 2a o b y ribavirina.

### ***2.-Grupo de estudio***

Pacientes portadores de virus de hepatitis C, bajo tratamiento con PEG-IFN $\alpha$ 2 a o b y ribavirina, en seguimiento en la consulta externa de gastroenterología del hospital Lic. Adolfo López Mateos.

### ***3.-Grupo problema***

Mismo grupo

### ***4.-Grupo testigo***

Como testigo se utilizaron los valores de referencia considerados como normales por los laboratorios que diseñaron los reactivos utilizados.

### ***5.-Tamaño de la muestra***

Se utilizó una muestra a conveniencia, compuesta por un grupo de 55 pacientes con infección crónica por VHC bajo tratamiento en el HRLALM del ISSSTE que reunieron todos los criterios necesarios para el estudio.

### ***6.-Criterios de inclusión***

Pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años, con infección crónica por VHC aceptados para protocolo de tratamiento con PEG-IFN $\alpha$ 2 a o b y Ribavirina

### ***7.-Criterios de exclusión***

- Etilismo crónico activo
- Enfermedad hepática descompensada (Child-Pugh B o C)
- Hepatocarcinoma u otra neoplasia maligna
- Enfermedad sistémica o crónico-degenerativa descompensada
- Edad mayor a 65 años
- Pacientes con mal apego a tratamiento antiviral
- Pacientes que presentan efectos adversos asociados a tratamiento antiviral
- Pacientes ya demostrados como no respondedores a tratamiento antiviral
- Pacientes que no brinden consentimiento para ser incluidos en el estudio

### ***8.-Criterios de eliminación***

- Defunción
- Pacientes que desarrollen intolerancia o efectos adversos del tratamiento antiviral
- Pacientes que deseen abandonar el estudio una vez iniciado

### ***9.-Cédula de recolección de datos***

NOMBRE	SEXO	EDAD	IL-15	Oxido Nítrico	Insulina

### ***10.-Descripción general del estudio***

Se llevó a cabo un estudio prospectivo, observacional, transversal, abierto, clínico, comparativo y aplicado durante el periodo de marzo a junio de 2009, en la población de pacientes infectados por VHC en el Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos del ISSSTE aceptados para protocolo de tratamiento antiviral con PEG-IFN alfa2a o b y ribavirina.

En estos pacientes se midieron niveles séricos de IL-15, de NO y de insulina. Estos últimos fueron comparados con los niveles control considerados normales indicados por el laboratorio que examinó las muestras, para posteriormente ser comparados entre sí. Al término del estudio, se buscó determinar si los niveles de IL-15, ON e insulina mostraron una relación en los pacientes con infección crónica por VHC.

### ***11.-Análisis de datos***

Realizado con el paquete estadístico SPSS versión 10.0

### ***12.-Métodos matemáticos para el análisis de los datos***

-Se calculó la media de cada una de las variables, y la comparación entre ellas se realizó mediante la prueba de "T" de Student, tomando en cuenta un valor significativo de "p" cuando éste fuera menor de 0.05.

### ***13.-Elementos físicos utilizados***

Kit comercial IL-15 immunoassay RD

Kit comercial NO immunoassay RD

Medición de niveles de insulina por laboratorio central ISSSTE

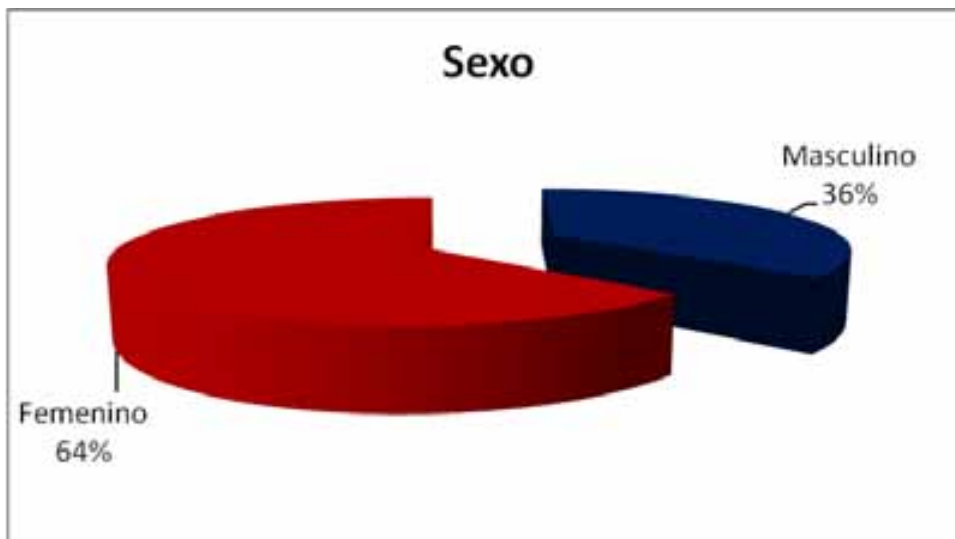
## VII.-RESULTADOS

Se estudiaron muestras séricas de un total de 55 pacientes con infección crónica por VHC que han recibido tratamiento antiviral en el HRLALM, de los cuales 20 pertenecen al sexo masculino (36.4%) y 35 al sexo femenino (63.6%) (Tabla 1, gráfica 1), cuyas edades oscilaron entre los 35 y los 65 años.

**Tabla 1.** Distribución de pacientes por sexo.

SEXO					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Masculino	20	36.4	36.4	36.4
	Femenino	35	63.6	63.6	100.0
	Total	55	100.0	100.0	

Fuente: Directa



**Gráfica 1.** Porcentaje de pacientes estudiados según sexo.



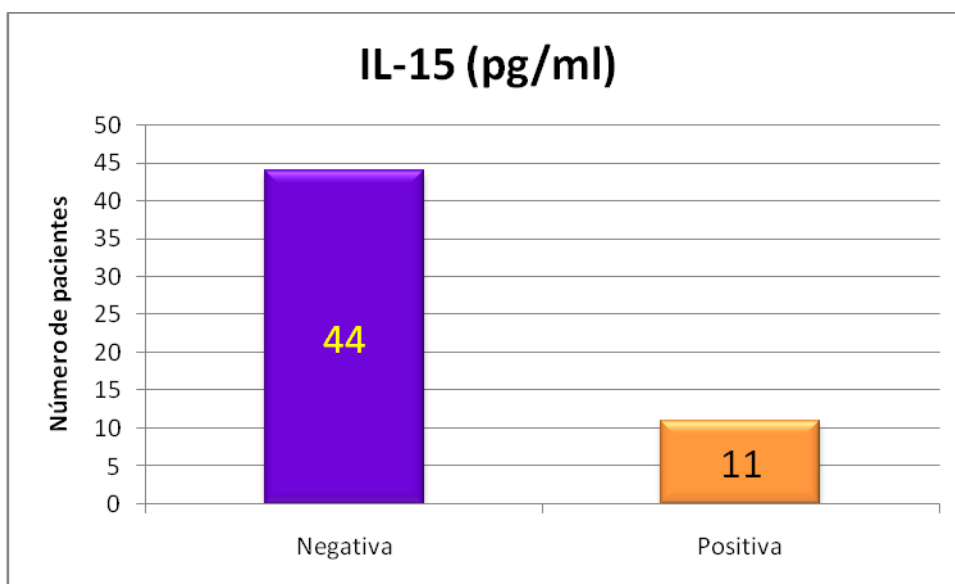
Fuente: Directa

En estas muestras se midieron niveles séricos de IL-15, encontrando 44 pacientes con niveles negativos (no detectables) (80%) y 11 pacientes con niveles positivos (detectables) (20%) (Tabla 2, Gráfica 2).

**Tabla 2.** Distribución de niveles séricos de IL-15

		15 (pg/ml)			
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	IL-15 (pg/ml) Negativa	44	80.0	80.0	80.0
	IL-15 (pg/ml) Positiva	11	20.0	20.0	100.0
	Total	55	100.0	100.0	

Fuente: Directa



**Gráfica 2:** Distribución de niveles de IL-15

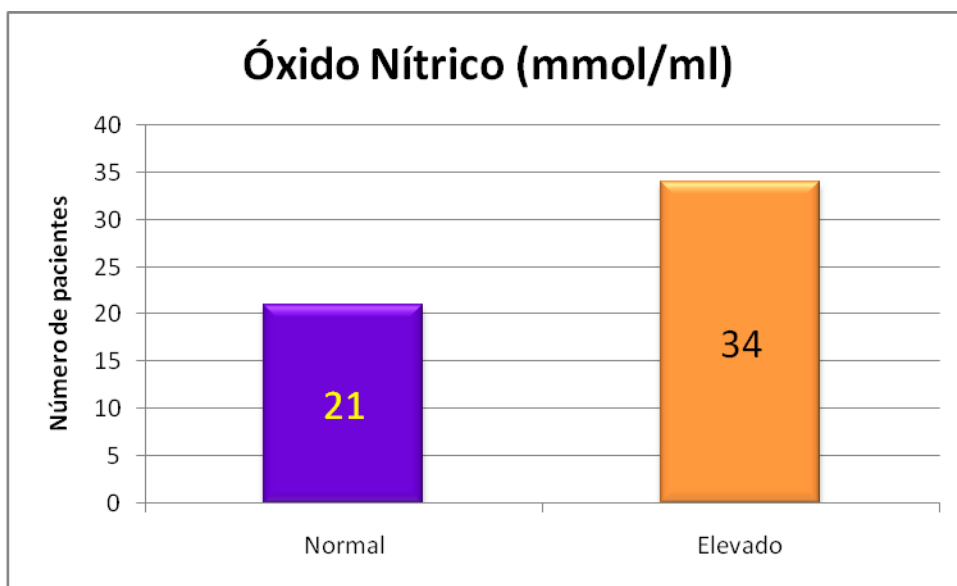
Fuente: Directa

Tras cuantificar los niveles séricos de NO en todas las muestras, se encontró que 21 pacientes (38.2%) presentaron niveles dentro de rangos normales (considerados como una cifra menor a 5 mmol/ml), mientras que 34 pacientes (61.8%) mostraron niveles por arriba del límite normal (Tabla 3, Gráfica 3).

**Tabla 3.** Distribución de niveles séricos de NO

		ON			
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Oxido Nítrico Normal	21	38.2	38.2	38.2
	Oxido Nítrico Elevado	34	61.8	61.8	100.0
Total		55	100.0	100.0	

Fuente: Directa



**Gráfica 3:** Distribución de niveles séricos de NO

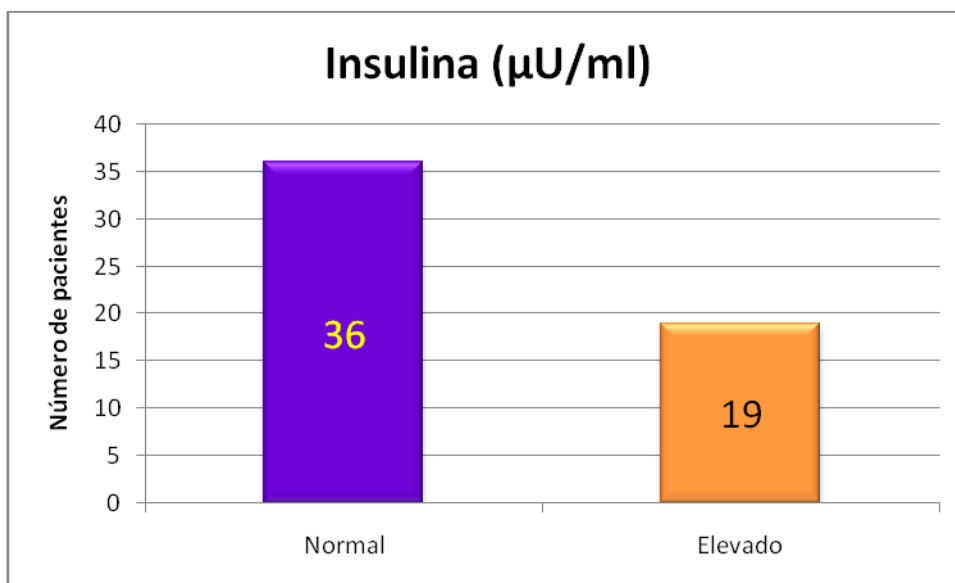
Fuente: Directa

Los niveles séricos de insulina se encontraron dentro de límites normales (considerados menores a 20  $\mu\text{U}/\text{ml}$ ) en 36 pacientes (65.5%), mientras que en 19 muestras (34.5%) dichos niveles se detectaron por arriba del límite superior normal (Tabla 4, Gráfica 4).

**Tabla 4.** Distribución de niveles séricos de insulina

INSULINA					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Insulina Sérica Normal	36	65.5	65.5	65.5
	Insulina Sérica Elevada	19	34.5	34.5	100.0
	Total	55	100.0	100.0	

Fuente: Directa



**Gráfica 4.** Distribución de niveles séricos de insulina

Fuente: Directa

Al dividir los grupos tomando como variable independiente a IL-15, el nivel promedio de NO encontrado en los pacientes con IL-15 no detectable fue de 7.49 mmol/ml, mientras que en los pacientes con IL-15 en niveles detectables, la cifra promedio de NO fue de 16.50 mmol/ml (Tabla 5).

**Tabla 5.** Niveles medios de NO según IL-15

Descriptive Statistics				
15 (pg/ml)		N	Mean	Std. Deviation
IL-15 (pg/ml) Negativa	ON_CONC	44	7.4940	6.4866
	Valid N (listwise)	44		
IL-15 (pg/ml) Positiva	ON_CONC	11	16.5000	11.0349
	Valid N (listwise)	11		

*Fuente: Directa*

De la misma manera, al utilizar nuevamente IL-15 como variable independiente, el promedio de los niveles séricos de insulina en el grupo con IL-15 no detectable fue de 23.19 U/ml, mientras que en pacientes con niveles detectables de IL-15 fue de 30.64 U/ml, sin mostrar diferencia significativa (Tabla 6).

**Tabla 6.** Niveles medios de insulina sérica según IL-15

Descriptive Statistics				
15 (pg/ml)		N	Mean	Std. Deviation
IL-15 (pg/ml) Negativa	INSUL	44	23.1955	26.5466
	Valid N (listwise)	44		
IL-15 (pg/ml) Positiva	INSUL	11	30.6455	25.3234
	Valid N (listwise)	11		

*Fuente: Directa*

Al realizar análisis bivariado a los resultados arriba mencionados mediante prueba de “T” de Student, se encontró que los niveles séricos de insulina no se relacionan con la positividad o negatividad de IL-15 ( $p=0.40$ ); por el contrario, una relación estadísticamente significativa entre la detección de IL-15 con los niveles séricos de NO ( $p = 0.003$ ) sí fue detectada (Tabla 7).

**Tabla 7.** Análisis bivariado de IL-15 con NO e insulina mediante prueba “T” de Student

		Independent Samples Test								
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
INSULINA	Equal variances assumed	1.395	.243	-.841	53	.404	-.14	.16	-.46	.19
	Equal variances not assumed			-.789	14.346	.443	-.14	.17	-.51	.23
ON	Equal variances assumed	5119.800	.000	-3.111	53	.003	-.48	.15	-.78	-.17
	Equal variances not assumed			-6.266	43.000	.000	-.48	7.62E-02	-.63	-.32

Fuente: Directa

## VIII.-DISCUSIÓN

En la literatura mundial son ya bien conocidas las alteraciones que presentan diversas citocinas y moléculas proinflamatorias en los pacientes con infección crónica por VHC. Sin embargo, la mayoría de los estudios sólo han buscado comparar una misma variable entre dos grupos similares, o relacionar un máximo de dos variables en esta población de pacientes.

Las metas que perseguía este estudio eran, en primer lugar, determinar los valores séricos de tres moléculas que, como se vio en el marco teórico, juegan un importante papel en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias en diversos tejidos, y que se cree pueden ser determinantes para la evolución a cronicidad del VHC. En segundo lugar, se buscó encontrar una relación entre dichas variables, con el fin de descubrir posibles relaciones fisiopatológicas entre ellas, y así proponer nuevas vías de investigación.

Como se esperaba, los niveles séricos de IL-15 en el mayor porcentaje de la población de pacientes con infección crónica por VHC se encuentran bajos o indetectables, lo que puede muy bien servir como evidencia de una posible disfunción en los sistemas de inmunidad innata mediados por una respuesta Th1, llevando a una falla en la actividad celular de defensa y permitiendo la evolución de la infección hacia la cronicidad.

Por otro lado, los niveles de insulina en la mayoría de los pacientes de nuestra muestra se encontraron dentro de límites normales. Este hallazgo se contrapone con lo publicado por estudios similares, que establecen que sobre todo en las mujeres infectadas por VHC los niveles de insulina tienden a elevarse, sirviendo como marcadores de un estado de resistencia sistémica y hepática probablemente desencadenado por el proceso inflamatorio viral. El mayor problema con esos estudios es que los pacientes que muestran

niveles elevados de insulina también tienden a presentarse con cierto grado de sobrepeso y esteatosis hepática, lo que no permite determinar una verdadera relación causa-efecto entre ambos factores; es decir, si es el VHC el que provocó la resistencia a la insulina y a la larga llevó a sobrepeso y esteatosis, o si por el contrario es el sobrepeso previamente existente el que condicione la resistencia y una mayor inflamación hepática que puede llevar a cronicidad y fibrosis la infección por VHC, siendo esta última la teoría más apoyada hasta el momento.

Los hallazgos más interesantes de nuestro estudio se relacionan con los niveles séricos de NO, ya que en forma inesperada se encontró que los pacientes que presentan actividad de IL-15 detectable son quienes muestran también los mayores niveles de NO, con una asociación significativa tras el análisis bivariado por "T" de Student. Una interpretación a estos hallazgos podría ser que la elevación de IL-15 desencadena una respuesta inflamatoria hepática persistente, inicialmente por inmunidad celular innata y posteriormente por linfocitos T de memoria, lo que a su vez provoca daño al endotelio y a los hepatocitos (tanto infectados como cercanos al sitio de inflamación), con posterior inducción de eNOS e iNOS, elevación en los niveles y consumo de arginina y finalmente sobreproducción de NO, mismo que a su vez puede perpetuar el proceso inflamatorio a través de la liberación de radicales libres de oxígeno, aumentando así el daño hepático. Sin embargo, por el tamaño de nuestra muestra esto apenas puede ser una especulación, y se requerirá de más investigación a este respecto para corroborar nuestros hallazgos y encontrar una explicación causal más completa, si la hubiese.

## IX.-CONCLUSIONES

En la mayor parte de los pacientes con infección crónica por VHC analizados en este estudio los niveles de IL-15 se encontraron indetectables, lo que puede explicar en parte su evolución a cronicidad. Por otro lado, aunque los niveles séricos de insulina no mostraron relación con la IL-15, los niveles de NO sí van de la mano con la detección o no detección de esta citocina, lo que puede sugerir la presencia de un nexo fisiopatológico entre la producción de ambas moléculas, aunque se requiere de mayores estudios para establecer con más firmeza esta asociación.



## X.-BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Eugene R. Schiff, Willis C. Maddrey; *"Schiff's Diseases of the Liver" Tenth Edition 2007; Lippincott Williams & Wilkins; Vol 1. 807-863*
- 2.-Marc G. Ghany, Doris B. Strader et al. *"Diagnosis, Management and Treatment of Hepatitis C: An Update"; Hepatology, Vol. 49, No. 4, April 2009; 1335-1374*
- 3.-Informe OMS sobre prevalencia mundial de la infección por VHC. OMS 2003
- 4.-Dr. Misael Uribe, Dr. Nahúm Méndez-Sánchez; *"Hepatitis C en México" (Consenso de Hepatitis C); Revista Mexicana de Gastroenterología, Vol. 67, No. 52, Suplemento 2, 2002; S2-7 a S2-8*
- 5.-Dra. Laura Esthela Cisneros Garza y Cols., *"Guías Clínicas de Diagnóstico y Tratamiento de Hepatitis C: Epidemiología"; Revista Mexicana de Gastroenterología, 2005, Vol. 83, No.42; 177-178*
- 6.-Benítez-Arvizu y Cols. *"Prevalencia del Virus de Hepatitis C en el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza"; Rev Med IMSS 2006; 44(3): 227-233*
- 7.-Raúl Contreras Omaña, Xóchitl García-Samper y Cols; *"Experiencia de Siete Años en el Tratamiento de Pacientes con Infección Crónica por Virus de Hepatitis C (VHC) en el Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos del ISSSTE"; Rev. Gastroenterol. Mex. Vol. 72, Supl 2, 2007: 258*
- 8.-Nahúm Méndez, Misael Uribe, *"Conceptos Actuales en Hepatitis C"; 2ª Edición, Editorial McGraw-Hill, México D.F., 2005.*
- 9.-Barrera JM et al. *"Persistent Hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusional hepatitis C"; Hepatology 1995; 21(3): 639-644*

- 10.-Kanda T. et al. "Acute Hepatitis C Virus infection, 1986-2001: a rare cause of fulminant hepatitis in Chiba, Japan"; *Hepatogastroenterology* 2004;51 (56): 556-558
- 11.-Sanaa M. Kamal, MD PhD; "Acute Hepatitis C: A Systematic Review"; *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1283-1297
- 12.-Egyptian Ministry of Health annual Report 2007.  
<http://www.mohe.gov.eg>
- 13.-Mohamed MK; "Epidemiology of HCV in Egypt 2004"; *Afro-Arab Liver J* 2004;3:41-52
- 14.-Teresa Santantonio et al; "Acute Hepatitis C: Current status and remaining challenges (Review)"; *Journal of Hepatology* 49 (2008) 625-633
- 15.-Kenny-Walsh E. "Clinical Outcomes after Hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin"; *Irish Hepatology Research Group. N Engl J Med* 1999; 340(16):1228-1233
- 16.-Seeff LB et al. "Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B, and type C hepatitis: A National Heart, Lung and Blood Institute collaborative study"; *Hepatology* 2001;33(2):455-563
- 17.-Pagliaro L. et al; "Natural History of Chronic Hepatitis C"; *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(1):28-44
- 18.-Rosember WM; "Success in treating mild chronic hepatitis C: different outcomes-new guidelines?"; *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14(6):595-597
- 19.-Kay EW et al; "Mild abnormalities in liver histology associated with chronic hepatitis: distinction from normal liver histology"; *J Clin Pathol* 1997;50(11):929-931
- 20.-Renou C. et al; "Relevance of moderate isolated thrombopenia as a strong predictive marker of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus"; *Am J Gastroenterol* 2001; 96(5):1657-1659

- 21.-Vázquez-Elizondo G, Uribe-Esquivel M, Méndez-Sánchez N y Cols; "Tratamiento con Danazol de la Trombocitopenia Inducida por cirrosis"; *Rev Gastroenterol Mex* 2007;Vol 72, Supl ; 259
- 22.-John G. McHutchison, MD, et al; "Eltrombopag for Thrombocytopenia in Patients with Cirrhosis Associated with Hepatitis C"; *N Engl J Med* 2007;357:2227-2236
- 23.-Edoardo G. Giannini, MD, PhD, et al; "Platelet Count/Spleen Diameter Ratio for the Noninvasive Diagnosis of Esophageal Varices: Results of a Multicenter Prospective, Validation Study"; *Am J Gastroenterol* 2006;101:2511-2519
- 24.-Manns MP et al; "Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection"; *J Hepatol* 1999;31(suppl):39-42
- 25.-Marlo García-Carrasco y Cols; "Extrahepatic Autoimmune Manifestations of Chronic Hepatitis C Virus Infection"; *Annals of Hepatology* 2006; 5(3):July-September: 161-163
- 26.-M. Romero-Gómez y cols.; "Hepatitis C: Crioglobulinemia y Linfoma No Hodgkin"; *Rev Esp Enf Digest (Madrid)* Vol. 100, No. 3, pp 164-170; 2008
- 27.-J. Rasenack; "Viral Hepatitis Diagnostics", Revised Edition 2008; *Medizinische Universitätsklinik Freiburg, Germany; Falk Foundation e.V.* Pp.18-25
- 28.-Helen S. Yee et al; "Management and Treatment of Hepatitis C Viral Infection: Recommendations from the Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center Program and the National Hepatitis C Program Office"; *Am j Gastroenterol* 2006;101:2360-2378
- 29.-American Gastroenterological Association; "American Gastroenterological Association Medical Position Statement on the Management of Hepatitis C"; *Gastroenterology*, January 2006;130:225-230
- 30.-Emmet B. Keeffe; "Treatment of Chronic Hepatitis C Virus Infection"; *Gastroenterol Hepatol* 2006;101:84-88

31.-Jean Dubuisson; "Hepatitis C Virus Proteins"; *World J Gastroenterol* 2007; 13(17):2406-2415

32.-Jean-Michel Pawlotsky et al; "The Hepatitis C Virus Life Cycle as a Target for New Antiviral Therapies"; *Gastroenterology* 2007;132:1979-1998

33.-Thomas Von Hahn, Charles M. Rice; "Hepatitis C Virus Entry", *Journal of Biological Chemistry* 2008; February 15, Volume 283, Number 7, 3689-3694

34.-Raymond S. Koff; "Future Therapies for Chronic Hepatitis C"; *Gastroenterol Hepatol* 2008;45:128-133

35.-Aihua Zheng et al; "Claudin-6 and Claudin-9 Function as Additional Coreceptors for Hepatitis C Virus"; *Journal of Virology*, Nov 2007; p. 12465-12471

36.-Sonia Molina et al; "The Low-Density Lipoprotein Receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus"; *Journal of Hepatology* 46 (2007) 411-419

37.-Ted Bader et al; "Fluvastatin Inhibits Hepatitis C Replication in Humans"; *Am J Gastroenterol* 2008;103:1383-1389

38.-Dawn M. Torres et al; "HCV Replication and Statin Pleotropism: An Adjuvant Treatment Panacea?"; *Am J Gastroenterol* 2008;103:1390-1392

39.-Mirjam B. Zeisel et al; "Neutralizing Antibodies in Hepatitis C Virus Infection"; *World J Gastroenterol* 2007; September 28;13(36): 4824-4830

40.-Paolo Conca, Giovanni Tarantino; "Hepatitis C virus lymphotropism and peculiar immunological phenotype: Effects on natural history and antiviral therapy"; *World J Gastroenterol* 2009; May 21; 15(19):2305-2308

41.-Christoph Neumann-Haefelin et al; "Host and Viral Factors contributing to CD8+ T cell failure in Hepatitis C Virus Infection"; *World J Gastroenterol* 2007; September 28; 13(36):4839-4847

42.-Nasser Semmo, Paul Klenerman; "CD4+ T cell responses in Hepatitis C Virus infection"; *World J Gastroenterol* 2007;September 28; 13(36): 4831-4838

43.-Lake-Bakaar G. et al; "Nitric Oxide and Chronic VHC and HIV infections"; *Digestive Diseases and Science* 2001; Vol. 46, No. 5, 1072-1076

44.-Machado MV et al; "Insuline resistance and steatosis in chronic hepatitis C"; *Ann Hepatol* 2009; 8 Suppl 1:567-575

45.-Castera L; "Steatosis, Insuline Resistance and fibrosis progression in chronic hepatitis C"; *Minerva Gastroenterol Dietol* 2006 Jun; 52(2): 125-134

46.-Castera L. et al; "Hepatitis C Virus-induced hepatocellular steatosis"; *Am J Gastroenterol* 2005 Mar; 100(3): 711-715

47.-Ramalho F; "Hepatitis C Virus infection and liver steatosis"; *Antiviral Res* 2003 Oct; 60(2): 125-127

48.-Eva Billebeck et al; "Regulatory T cells in viral hepatitis"; *World J Gastroenterol* 2007; September 28;13(36):4858-4864

49.-Rowan AG et al; "Hepatitis C Virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF-beta"; *J Immunol* 2009; May 15;182(10):5889-5890

50.-Afzali B et al; "The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease"; *Clin Exp Immunol* 2007 Apr; 148(1):32-46

51.-Korn T et al; "IL-17 and Th17 cells"; *Annu Rev Immunol* 2009;27: 485-517

52.-Chen Z et al; "Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells"; *Immunol Res* 2008; 41(2):87-102

53.-Bettelli E, Korn T; "Th17: the third member of the effector T cell trilogy"; *Curr Opin Immunol* 2007 Dec; 19(6):652-657

54.-Jean-Claude Trinchet et al; "Hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis c virus-related chronic liver disease"; *World J Gastroenterol* 2007 May 7; 13(17):2455-2460

55.-Anna Linda Zignego et al; "Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders: an overview"; *World J Gastroenterol* 2007 May 7; 13(17):2467-2478

56.-H Le Guillou-Guillemet et al; "Genetic diversity of the Hepatitis C Virus: Impact and issues in the antiviral therapy"; *World J Gastroenterol* 2007 May 7; 13(17):2416-2426

57.-Joerg Timm, Michael Roggendorf; "Sequence diversity of Hepatitis C Virus: Implications for immune control and therapy"; *World J Gastroenterol* 2007 September 28; 13(36):4808-4817

58.-Henry Radziewicz et al; "Memory CD8+-T cell differentiation in viral infection: a cell for all seasons"; *World J Gastroenterol* 2007 September 28; 13(36):4848-4857

59.-Medicina Molecular de FIBAO: "Inteferón gamma"; fecha de publicación 16-10-2007. [www.medmol.es](http://www.medmol.es)

60.-Ute-Christiane Meier et al; "Shared Alterations in NK Cell Frequency, Phenotype, and Function in Chronic Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections"; *Journal of Virology*, Oct 2005; p. 12365-12374

61.-Ursula Plöckinger MD, et al; "Hepatitis-C Patients Have Reduced Growth Hormone (GH) Secretion Wich Improves During Long-Term Therapy With Pegylated Inteferon-alfa"; *Am J Gastroenterol* 2007;102:2724-2731

62.-Richard Fischer et al; " Hepatitis C virus infection and apoptosis"; *World J Gastroenterol* 2007 September 28;13(36):4865-4872

63.-Elaine F. Meurs, Adrien Breiman; "The Interferon Inducing Pathways and the Hepatitis C Virus"; *World J Gastroenterol* 2007 May 7; 13(17): 2446-2454

64.-Friedemann Weber; "Interaction of hepatitis C virus with the type I interferon system"; *World J Gastroenterol* 2007 September 28; 13(36): 4818-4823

65.-Izzo F. et al; "Pegylated arginine deaminase lowers hepatitis C viral titers and inhibits nitric oxide synthesis"; *J Gastroenterol Hepatol* 2007 Jan; 22(1) 86-91

66.-Strickler HD et al; "The Insulin-like growth factor axis and the risk of liver disease in Hepatitis C Virus/HIV co-infected women"; *AIDS* 2008 Feb 19;22(4):527-531

67.-Francesco Negro, Mahnaz Alaei; "Hepatitis C Virus and type 2 diabetes"; *World J Gastroenterol* 2009 April 7; 15(13): 1537-1547

68.-Burton JD, Bambford RN et al; "A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukaemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells"; *PNAS* 1994;91:4935-4939

69.-Grabstein KH et al; "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor"; *Science* 1994;264:965-968

70.-Alicia Santos Savio; "Interleucina-15: una citocina relevante en la homeostasis linfoide y en enfermedades autoinmunes"; *Biotechnología Aplicada* 2006;23:79-86

71.-Paxton RJ; "Measurement of Interleukin 15"; *Curr Protoc Immunol* 2001 May; Chapter 6:Unit 6.22

72.-Ueda T et al; "Serum interleukin-15 level is a useful predictor of the complications and mortality in severe acute pancreatitis"; *Surgery* 2007 Sep;142(3):319-326

73.-Pappa C et al; "Serum levels of interleukin-15 and interleukin-10 and their correlation with proliferating cell nuclear antigen in multiple myeloma"; *Cytokine* 2007 Feb;37(2):171-175

- 74.-Hamzaoui K et al; "Levels of IL-15 in serum and cerebrospinal fluid of patients with Behcet's disease"; *Scand J Immunol* 2006 Dec;64(6): 655-660
- 75.-Todd a. Fehniger, Michael A. Caligiuri; "Interleukin-15: biology and relevance to human disease"; *Blood* 2001 97:14-32
- 76.-Yonekawa C et al; "IL-15 levels in patients with acute hepatic failure"; *Critical Care* 2001;43(2):1245-1252
- 77.-Suzuki A et al; "Interleukin-15 increases hepatic regenerative activity"; *J Hepatol* 2006 Sep;45(3)347-349
- 78.-Yamaji K et al; "Interferon-alpha/beta upregulate IL-15 expression in vitro and in vivo: analysis in human hepatocellular carcinoma cell lines and in chronic hepatitis C patients during interferon-alpha/beta treatment"; *Cancer Immunol Immunother* 2006 Apr;55(4):394-403
- 79.-Ebithara T, Matsumoto M, Seva T; "HCV and innate immunity"; *Uirusu* 2008 Jun;58(1):19-26
- 80.-Irshad M et al; "Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects"; *Int Rev Immunol* 2008;27(6):497-517
- 81.-Hiroishi K, Ito T, Imawari M; "Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence"; *J Gastroenterol Hepatol* 2008 Oct;23(10):1473-1482
- 82.-Sepiashvili RI et al; "Hepatitis C virus: biology, immunopathogenesis, and NK/NKT cell during viral persistence"; *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2006 Nov-Dec;(7):109-116