



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN GÉNICA DE SOCS3, OAS2, IP10 E ISG15 Y LA
RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON HEPATITIS C
CRÓNICA**

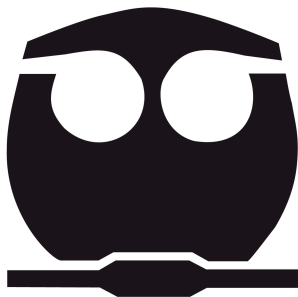
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

ROSAURORA SÁNCHEZ ROMERO



MÉXICO, D.F.

2011



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: **RODOLFO PASTELIN PALACIOS**

VOCAL: Profesor: **LAURA BONIFAZ ALFONZO**

SECRETARIO: Profesor: **CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACÍAS**

1er. SUPLENTE: Profesor: **ENRIQUE ORTEGA SOTO**

2° SUPLENTE: Profesor: **MAYRA PÉREZ TAPIA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES,
CENTRO MÉDICO NACIONAL S.XXI, IMSS.**

ASESOR DEL TEMA: DRA. LAURA BONIFAZ ALFONZO

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. IRIS ANGÉLICA FERIA ROMERO

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): ROSAURORA SÁNCHEZ ROMERO

(nombre (s) y firma (s))

En memoria de Ericson Sucroe-Sucrolín mi querido hermano.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Laura Bonifaz Alfonso por brindar las facilidades para realizar la presente tesis que me permitió aprender mucho y crecer.

A la Dra. Iris Fería por su paciencia, disposición, apertura, entusiasmo y amor que comparte conmigo.

A Iliana Donají, la guarapera sensei, por siempre tener la disposición de ayudarme, por enseñarme a que el orden es necesario y hasta es una herramienta que optimiza tiempo y esfuerzo.

A todo el personal de UIMEN por prestarme los equipos, material y compartir sus sonrisas.

A todos mis compañeros de UIMEA y de UIMEN porque sinceramente me divertí mucho en mi estancia, no hubiera sido igual sin todos ustedes, en especial a Vinny, David, Miguel y Karina.

A Cynthia, la sis, porque en diez años hemos caminado juntas trayectos en ocasiones oscuros pero siempre compartiéndome su buen sentido del humor, nobleza, sinceridad, fuerza y determinación.

A Carito por compartir conmigo su sabiduría, su paciencia, su sonrisa, su entusiasmo, por impulsarme y transformar mi vida.

A mis amigos Marco y Andrés por escucharme en todo momento.

A mis amigas danzarinas la Jazmína, Antonía, a mi maestro Mercurio y a mis maestras Xóchitl, Diana Contreras y Diana Fernández por enriquecer mi vida y acompañarme en descubrirme y en liberarme.

A mis maestros José Landeros, Ángeles Martínez, Norma Silvia Sánchez, Ruth Martín por transmitirme sus conocimientos de manera divertida y además porque estuvieron al tanto en mi época de duelo.

A Laura Carreón y la Dra. Marta Pérez por iniciarme en la investigación. También a Cristina y a Lulú por brindarme su apoyo y comprensión en todo momento.

A Alfonsina, Paulina y Olivia por su amistad incondicional.

A mi padre por la educación que me brindó.

A mi madre por apoyarme en todo momento, impulsarme y por su tolerancia.

A mi abuelita Tere por sus consejos amorosos.

Agradezco al universo y confío en el camino en el que estoy.

ÍNDICE

Índice de tablas.....	i
Índice de figuras.....	i
Glosario de abreviaturas.....	ii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Virus de la hepatitis C	2
Desarrollo de la infección por VHC.....	5
Respuesta inmune innata en la infección por VHC.....	8
Genes inducibles por INF (ISGs).....	8
Gen inducido por interferón-15 (ISG15).....	8
Gen de la proteína inducible por INF- γ (IP10).....	9
Gen 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (OAS2).....	9
Gen supresor de señalización citocinas 3 (SOCS3).....	10
INF γ como tratamiento en pacientes infectados con VHC y su relación con la expresión de ISGs.....	11
ANTECEDENTES.....	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO.....	15
METODOLOGÍA.....	17
Pacientes y controles.....	17
Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	17
Extracción de ARN total con Trizol.....	17
Síntesis de cDNA por retrotranscripción del ARN total.....	17
Prueba de control de calidad del cDNA.....	18
Amplificación de cDNA para los genes SOCS3, OAS2, IP10 e ISG15.....	18
Análisis estadístico.....	19
Consideraciones éticas.....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	34
CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIAS.....	39
ANEXO I.....	A

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Nombre y función de las proteínas que se codifican en el genoma del VHC.....	4
Tabla 2. Receptores de las células hepáticas que participan en la entrada del VHC.....	5
Tabla 3. Definiciones de la respuesta al tratamiento.....	12
Tabla 4. Edad, género, carga viral y la respuesta al tratamiento en la semana 12 de los pacientes infectados con VHC genotipo 1.....	21
Tabla 5. Edad, género, carga viral y la respuesta al tratamiento en la semana 12 de los pacientes infectados con VHC genotipo 2.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organización del genoma del virus de la hepatitis C.....	3
Figura 2. Modelo hipotético de la replicación del VHC.....	7
Figura 3. Degradación de ARN viral por la formación de oligoadenilatos.....	9
Figura 4. Rol del dominio SH2 en SOCS3.....	10
Figura 5. Respuesta al tratamiento con pegIFN α +ribavirina en pacientes infectados con genotipo de VHC 1 a la semana 12.	21
Figura 6. Respuesta al tratamiento con pegIFN α +ribavirina en pacientes infectados con genotipo de VHC 2 a la semana 12.	22
Figura 7. Gel de agarosa al 2% de productos de PCR de los genes GAPDH, SOCS3, ISG15, OAS2 e IP10.	23
Figura 8. Expresión relativa de ARNm de SOCS3.....	24
Figura 9. Expresión relativa de ARNm de IP10.....	25
Figura 10. Expresión relativa de ARNm de ISG15.....	26
Figura 11. Expresión relativa de ARNm de OAS2.....	27
Figura 12. Correlación lineal no paramétrica entre la expresión relativa de ARNm de OAS2 e ISG15 en EVR1.	28
Figura 13. Correlación lineal no paramétrica entre la expresión relativa de ARNm de OAS2 e ISG15	28

en EVR2.

Figura 14. Correlación lineal no paramétrica de la expresión relativa de ARNm de OAS2 y SOCS3 en EVR1.	29
Figura 15. Correlación lineal no paramétrica entre la expresión relativa de ARNm de SOCS3 e ISG15 en EVR1.	30
Figura 16. Correlación lineal no paramétrica entre la expresión relativa de ARNm de SOCS3 e ISG15 en EVR1.	30
Figura 17. Correlación lineal paramétrica de la expresión relativa de ARNm de ISG15 y SOCS3 en PNR1.	31
Figura 18. Relación SOCS3/OAS2 en pacientes con hepatitis C crónica.....	32
Figura 19. Relación SOCS3/ISG15 en pacientes con hepatitis C crónica.....	33
Figura 20. Relación SOCS3/IP10 en pacientes con hepatitis C crónica.....	33

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
ALT	Alanina-amino-transferasa
ANOVA	Análisis de Varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AST	Aspartato-amino-transferasa
CXCL10	Ligando de la quimiocina 10
CXCR3	Receptor de IP10
DPP4	Proteasa dipeptidilpeptidasa IV
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EoTR	Respuesta al finalizar el tratamiento
EVR	Respuesta viral temprana
EVR1	Muestra de sangre de pacientes con respuesta viral temprana antes del tratamiento
EVR2	Muestra de sangre de pacientes con respuesta viral temprana después del tratamiento
F	Femenino
GAPDH	Gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato
IFNAR	Receptor de IFN tipo I
INF	Interferón
INF α	Interferón alfa
INF β	Interferón beta
INF γ	Interferón gamma
IP10	Proteína inducible por IFN- γ
IRES	Sitio de entrada interna ribosomal (Internal Ribosomal Entry Site)
ISG15	Gen inducido por interferón-15

ISGs	Genes inducidos por interferón
Jak	Cinasa Janus
KCl	Cloruro de potasio
kg	Kilogramos
KIR	Región inhibidora de cinasas
LPS	Lipopolisacárido
M	Masculino
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimolar
MxA	Proteína resistente a mixovirus A
NA	No aplica
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de potasio
NaCl	Cloruro de sodio
NH ₄ SO ₄	Sulfato de amonio
NK	Célula citocida natural (Natural Killer)
nm	Nanómetro
NR	Sin respuesta al tratamiento
OAS2	Gen 2'-5'-oligoadenilato sintetasa
OASL	Gen parecido a 2'-5'-oligoadenilato sintetasa
PAMS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC's	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBS	Buffer de sulfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pegINF	Interferón pegilado
pH	Potencial hidrógeno
PKR	Proteína cinasa dependiente de ARN de doble cadena
PNR	Sin respuesta primaria
PNR1	Muestra de sangre de pacientes sin respuesta primaria antes del tratamiento

PNR2	Muestra de sangre de pacientes sin respuesta primaria después del tratamiento
rib	Ribavirina
RIG-I	Receptor del producto del gen inducible por ácido retinoico I
RT	Retrotranscripción
RVR	Respuesta viral rápida
RVS	Respuesta viral sostenida
seg	Segundos
SH2	Dominio de proteínas estructuralmente muy conservado en la proteína Src
SOCS3	Gen supresor de señalización citocinas 3
Src	Oncoproteína, cinasa de tirosina
Stat	Proteínas activadoras de señales de transducción y transcripción
TLR	Receptor tipo toll
UBP43/USP18	Peptidasa específica de ubiquitina 18
UI	Unidades Internacionales
UTR	Región no traducible (Untranslated region)
VHC	Virus de la hepatitis C

RESUMEN

Alrededor de 170 millones de personas en el mundo padecen hepatitis C crónica con un alto riesgo de desarrollar cirrosis y cáncer de hígado. En la hepatitis C crónica se administra interferón (INF) pegilado y ribavirina (pegINF+rib) como tratamiento, se puede comprobar que la respuesta al tratamiento fue efectiva si el virus de la hepatitis C es indetectable en sangre periférica 6 meses después de haber finalizado el mismo. Sin embargo, del 30-40% de pacientes con hepatitis C crónica no responde al tratamiento con pegINF+rib, el cual además de tener un costo elevado puede causar efectos adversos como depresión, anemia y enfermedades autoinmunes. Por lo que sería importante distinguir a los pacientes que responderán al tratamiento de los que no responderán antes de su administración. En este trabajo se evaluó la expresión de tres genes que se inducen en la vía de señalización de INF (ISGs), el gen inducido por interferón-15 (ISG15), el gen 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 2 (OAS2), el gen de la proteína inducida por INF- γ (IP-10) y un gen involucrado en la regulación negativa de la vía de señalización del INF, el gen supresor de señalización por citocinas 3 (SOCS3) con el fin de determinar si el análisis estadístico individual o por correlaciones lineales pueden diferenciar a los pacientes que responden de los que no responden al tratamiento en la semana 12, en otras palabras, aquellos pacientes que en la semana 12 no presentan carga viral manifiestan una respuesta viral temprana (EVR) y pacientes sin respuesta primaria (PNR) en el caso contrario. Para lo anterior se recolectó sangre periférica de pacientes con infección crónica por VHC antes y después de tratamiento, se aislaron las células mononucleares de las cuales se extrajo el ARN para la síntesis de ADN complementario (cDNA) por retrotranscripción y se realizó la semi cuantificación por la expresión de cada gen por PCR de punto final relativo utilizando como gen control gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH). Al comparar las muestras de los pacientes EVR y PNR antes del tratamiento se observó que la tendencia en los pacientes PNR es una menor expresión de ARN mensajero en los genes ISG15 y OAS2, una mayor expresión de SOCS3 y no se observaron diferencias en la expresión de IP10. En las correlaciones lineales el hallazgo más interesante fue una correlación positiva en la expresión de SOCS3 e ISG15 en EVR y una correlación negativa en PNR. A partir de lo anterior se realizó el índice de expresión SOCS3/ISG, dónde se observó una mayor tendencia en la expresión del gen SOCS3 en relación a cada ISG en los pacientes PNR. De esta manera, el análisis individual de los genes no brinda información suficiente que diferencie entre EVR y PNR en células mononucleares de sangre periférica antes del tratamiento. Sin embargo, el índice numérico de SOCS3/ISG podría ser en el futuro, un buen candidato que ayude a predecir la respuesta al tratamiento.

INTRODUCCIÓN

El término hepatitis se refiere a la inflamación del hígado, ésta se puede producir por alguna infección viral, sustancias tóxicas como alcohol, drogas y otros factores [1]. Desde el punto de vista clínico se conocen distintos tipos de hepatitis virales desde la hepatitis A hasta la F. La hepatitis C se debe a la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) que se transmite mediante transfusiones con sangre contaminada, inyecciones, por vía sexual y perinatal. Una a dos semanas después del contagio es posible detectar el VHC en suero y alrededor de la semana siete se puede presentar un incremento en los valores plasmáticos de hasta 10 veces con respecto a los valores normales de la enzima alanina-amino-transferasa (ALT). Los síntomas iniciales que se pueden presentar son gripe, fatiga, fiebre, sudoración nocturna, pérdida de apetito, náusea, vómito, diarrea, ictericia, indigestión, dolor de cabeza, abdominal, muscular o en articulaciones [1, 2]. Por lo general, los pacientes con hepatitis C son asintomáticos [3-8] y desafortunadamente en el mundo existen alrededor de 170 millones de personas que padecen esta enfermedad con alto riesgo de desarrollar cirrosis y cáncer de hígado[1, 9-12].

Virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) fue identificado por Choo et al. en 1989 mediante técnicas de biología molecular [10]. El VHC pertenece a la familia *Flaviviridae* género *Hepacivirus*, existen 6 genotipos y más de 100 subtipos de VHC, mide de 55 a 65 nm, tiene envoltura y el material genético que lo compone es ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla positiva. Su genoma se compone de 9024 a 9111 nucleótidos dependiendo del genotipo, está flanqueado por regiones no traducibles (Untranslated Regions, UTR) las cuales contienen señales que coordinan y sintetizan el ARN y las proteínas virales, como se ilustra en la figura 1A. El extremo 5'-UTR del virus tiene un sitio de entrada interna ribosomal (Internal Ribosomal Entry Site, IRES) el cual se une a la subunidad ribosomal 40S del huésped e inicia la traducción de una poliproteína que se procesa en 10 proteínas estructurales y no estructurales, por la intervención de las proteasas del virus y de las células hepáticas como se muestra en la figura 1B y la tabla 1. Por otro lado, el extremo 3'-UTR al parecer promueve la replicación del virus, está organizado en tres regiones: una región variable, una región poliuridina/uridina-citidina (Poli U/UC) y una región terminal conservada de 98 nucleótidos llamada extremo-X [11, 13].

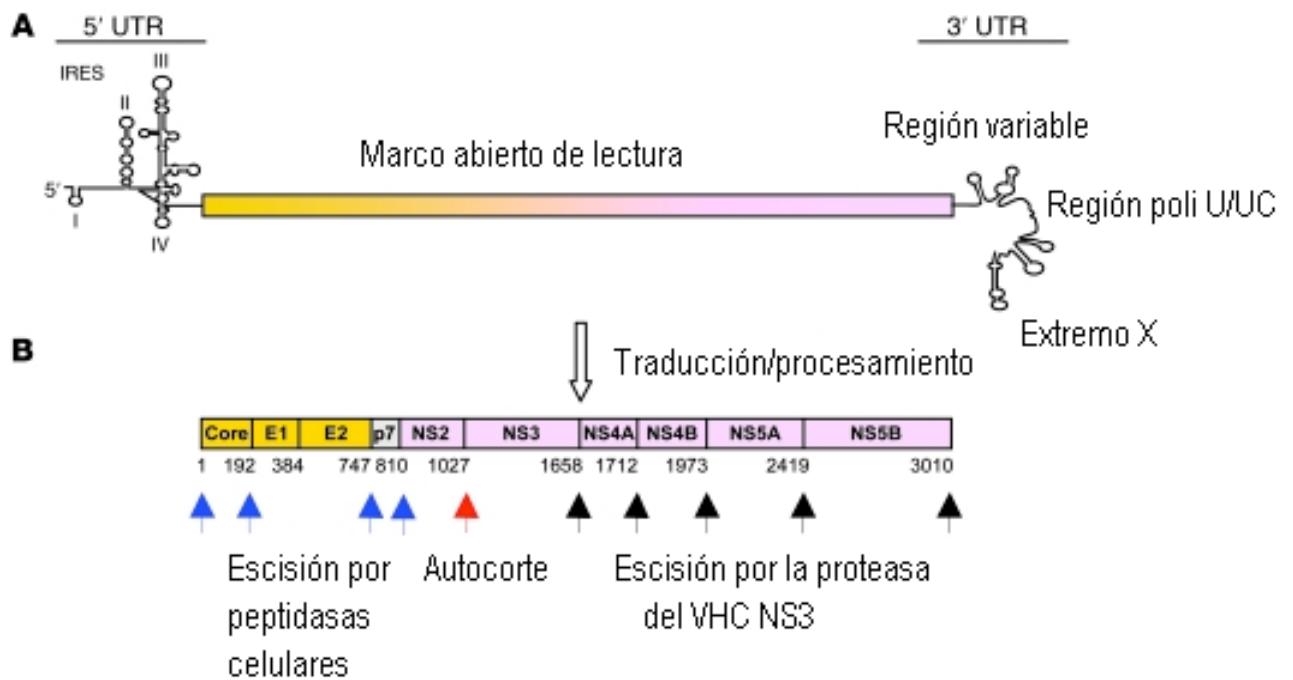


Figura 1. Organización del genoma del virus de la hepatitis C. (A) El RNA de cadena sencilla codifica un marco de lectura amplio 3flanqueado por 2 UTR's. (B) Poliproteína traducida, los números indican las posiciones de los aminoácidos donde se lleva a cabo la escisión por proteasas. Modificado de *Reherman, 2009*.

Tabla 1. Nombre y función de las proteínas que se codifican en el genoma del VHC [11].

Proteína		Función
Estructurales	Central (core)	Formación de la nucleocápside una estructura proteica que envuelve el ARN del virus.
	F/ARF	Marco de lectura (frameshift, F)/ Marco alternativo de lectura (Alternative Reading Frameshift, ARF) con función desconocida.
	E1	Envoltura 1, es una glicoproteína necesaria para la entrada y fusión del virus a células del hígado.
	E2	Envoltura 2, es una glicoproteína necesaria para la entrada y fusión del virus a células del hígado.
No Estructurales	P7	Probablemente canal del ión calcio.
	NS2	Proteasa. Proteína de vida media corta que después de hacer un autocorte con la proteína NS3 se degrada en el proteasoma.
	NS3	Actividad de NTPasa estimulada por ARN: Unión y desenrollamiento de las estructuras secundarias de ARN por hidrólisis de cualquier nucleósido trifosfato (NTP). Además forma parte de NS2-3 y NS3-4A.
	NS4A	Cofactor de la proteinasa NS3-4A esencial en el ciclo del virus ya que cataliza la ruptura de la poliproteína en las uniones NS3/NS4, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B.
	NS4B	Formación de red membranal para el complejo de replicación. Modula actividad de NS5B.
	NS5A	Replicación de ARN por la formación de complejos.
	NS5B	Polimerasa dependiente de ARN.

Desarrollo de la infección por VHC

Cuando el VHC entra al flujo sanguíneo, se asocia con lipoproteínas para su transporte al hígado donde se une a receptores de las células hepáticas descritos en la tabla 2 [12, 13].

Tabla 2. Receptores de las células hepáticas que participan en la entrada del VHC.

Receptor	Características principales
CD81	<p>Estructura. Glicoproteína y tetraspanina. Proteína que atraviesa cuatro veces la membrana y se asocia lateralmente con otras proteínas integrales de membrana formando dominios multiproteínicos.</p> <p>Localización. Ubicua (excepto en eritrocitos y plaquetas)</p> <p>Función. Adhesión celular, movilidad, metástasis, activación celular y transducción de señales.</p> <p>Función en la infección por VHC. Entrada del virus.</p>
SR-BI (Receptor basurero “scavenger” de clase B)	<p>Estructura. Glicoproteína transmembranal.</p> <p>Localización. Se expresa ampliamente en hígado, adrenales, ovario y testículo.</p> <p>Función. Transporte de colesterol en la membrana celular. Receptor de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de formas oxidadas de lipoproteínas de baja densidad (LDL).</p> <p>Función en la infección por VHC. Unión y entrada del virus.</p>
Claudina-1	<p>Estructura. Proteína transmembranal.</p> <p>Localización. Uniones estrechas del hígado y otros tejidos epiteliales.</p> <p>Función. Formación de uniones estrechas, sellan espacios intercelulares.</p> <p>Función en la infección por VHC. Post-unión.</p>
LDLR (Receptor de lipoproteínas de baja densidad)	<p>Estructura. Glicoproteína transmembranal.</p> <p>Localización. Ubicua.</p> <p>Función. Secuestra el colesterol que viene acoplado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL) del plasma.</p> <p>Función en la infección por VHC. Unión y entrada del virus.</p>
Heparan sulfato	<p>Estructura. Proteoglicano compuesto de unidades repetidas de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina.</p> <p>Localización. Ubicua. Superficie celular. El muy sulfatado se encuentra en hígado.</p> <p>Función. En angiogénesis, coagulación, sirve como sitio de anclaje virus y otros microorganismos.</p> <p>Función en la infección por VHC. Unión del virus.</p>
Ocludina	<p>Estructura. Tetraspanina.</p> <p>Localización. Uniones estrechas de tejidos epiteliales.</p> <p>Función. Formación de uniones estrechas, sellan espacios intercelulares.</p> <p>Función en la infección por VHC. Entrada del virus.</p>

Tabla 2(continuación). Receptores de las células hepáticas que participan en la entrada del VHC.

Receptor	Características principales
<p>DC-SIGN (No-integrina de adhesión intracelular de la molécula-3 específica a la célula dendrítica).</p>	<p>Estructura. Proteína integral de membrana. Lectina de unión a manosa. Localización. Diversos tejidos. Macrófagos del hígado (células de Kupfer). Función. Se unen a carbohidratos presentes en patógenos, promueven respuesta inmune innata por activación de complemento o por opsonización. Función en la infección por VHC. Unión y captura del virus por gran afinidad a E2.</p>
<p>L-SIGN (Integrina adherente específica a ICAM-3 de nódulo linfático de hígado).</p>	<p>Estructura. Proteína integral de membrana. Localización. Células endoteliales sinusoides del hígado y nodos linfáticos. Función. Se unen a carbohidratos presentes en patógenos, promueven respuesta inmune innata por activación de complemento o por opsonización. Función en la infección por VHC. Unión y captura del virus por gran afinidad a E2.</p>

Se ha propuesto que el VHC después de unirse a las células del hígado entra por endocitosis, ya que se fusionan varias vesículas endocíticas de la membrana plasmática que están cubiertas por la proteína clatrina. El pH ácido del endosoma hace que la nucleo-cápside del virus se rompa y libere su material genético para sintetizar las proteínas descritas en la tabla 1. La proteína NS4B induce la formación de membranas vesiculares (red membranal) que sirven de plataforma para formar el complejo de replicación. Se propone que el ARN viral se replica de forma semi-conservativa con la colaboración de la polimerasa NS5B para formar una doble cadena de ARN. En un primer paso, el ARN sirve como molde para sintetizar la cadena complementaria. Posteriormente, la polimerasa NS5B produce de 5 a 10 veces más cadenas molde que serán traducidas en la poliproteína. Una vez que se formaron las proteínas, los viriones se ensamblan y salen de la célula por exocitosis para continuar la infección a más hepatocitos (figura 2).

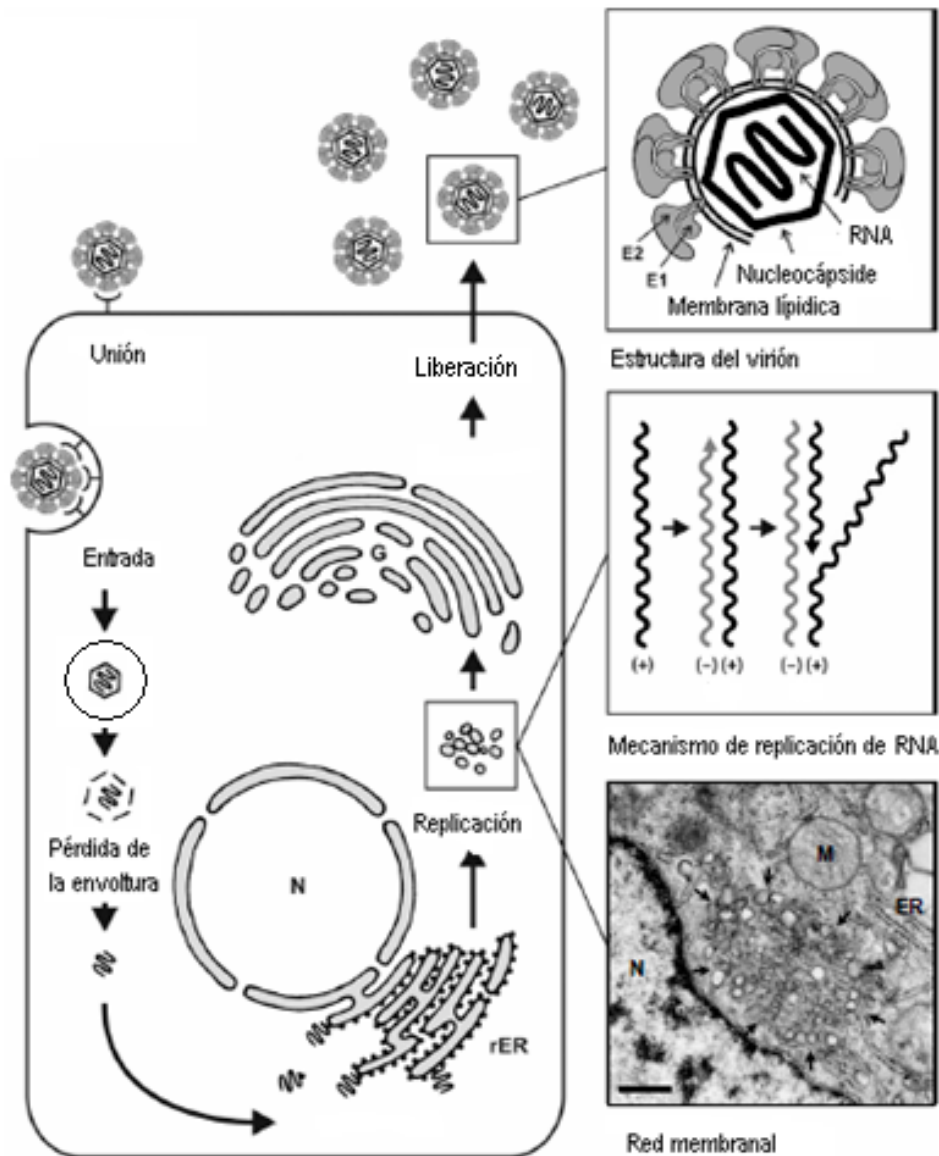


Figura 2. Modelo hipotético de la replicación del VHC. El VHC se une a las células del huésped por la interacción de las glicoproteínas de envoltura y los receptores mencionados en la tabla 1. El VHC es internalizado por endocitosis y se libera el genoma viral de la nucleocápside el cual es traducido. La proteína NS4B induce la formación de membranas vesiculares (referidas como red membranar). Estas membranas sirven como plataforma para el complejo de replicación. Después de la amplificación genómica y la expresión proteica, se ensamblan los viriones. El sitio de formación de las partículas virales puede llevarse a cabo en membranas intracelulares derivadas del retículo endoplásmico o del aparato de Golgi. Los nuevos viriones salen de la célula por la vía secretoria. El panel superior derecho muestra una representación del VHC. El panel de en medio muestra un modelo de replicación de la síntesis de RNA. El panel inferior muestra una micrografía electrónica de la red membranar señalada con flechas en células Huh7 compuesta de pequeñas vesículas embebidas en la matriz membranar. N: núcleo; ER: retículo endoplásmico; M: mitocondria. Modificado de Chevaliez y Pawlowsky, 2006.

Respuesta inmune innata en la infección por VHC

La inmunidad innata, por medio del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMS), se encarga de iniciar una respuesta contra agentes causantes de infección antes de que ésta se desarrolle. En la infección por VHC, los hepatocitos infectados reconocen la doble cadena de ARN del virus por medio del receptor tipo Toll 3 (TLR3) que se forma en la replicación y el receptor del producto del gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) reconoce el motivo de poliuridina 3'. Posteriormente los hepatocitos secretan interferón tipo I (INF) que incluye los subtipos de INF- α e INF- β .

Genes inducibles por INF (ISGs)

El INF se une a un receptor conocido como receptor de interferón (IFNAR) tanto en células infectadas como no infectadas. El IFNAR está acoplado a una familia de cinasas Janus (Jak) que fosforilan proteínas activadoras de señales de transducción y transcripción (Stat) las cuales al fosforilarse se dimerizan y se translocan al núcleo donde activan la expresión de cientos de genes llamados genes inducidos por interferón (ISGs). Los productos proteicos que se generan tienen como finalidad controlar la infección viral por distintos mecanismos como el bloqueo de la transcripción viral, la degradación del ARN viral, la inhibición de la traducción del virus, la interferencia en distintos pasos de la replicación, etc [16]. De la gran variedad de ISGs identificados, a continuación se mencionan tres y un regulador negativo de la vía de señalización de INF que son los que fueron evaluados en este trabajo.

Gen inducido por interferón-15 (ISG15)

ISG15 es un gen que se induce en infecciones virales, por LPS, durante el embarazo y después del tratamiento con INF; codifica para una proteína que se expresa en linfocitos, monocitos y fibroblastos promueve la producción de INF- γ en linfocitos T preactivados con un éster de forbol. Incrementa además la proliferación y función de las células asesinas naturales (NK). ISG15 pertenece a un grupo de proteínas parecidas a ubiquitina ya que tiene dos dominios parecidos a ésta [17]. Al igual que la ubiquitina se conjuga con diversas proteínas para regular su función o destino, entre ellas se encuentran los reguladores de la transducción de señales Jak1, Stat1, el receptor RIG y las proteínas antivirales recién sintetizadas que se inducen por INF-I como MxA y PKR. Por otra parte existen enzimas como UBP43 también llamada USP18 que deshacen la conjugación entre ISG15 y sus proteínas blanco [17-19]. De acuerdo con esto se ha propuesto que ISG15 puede jugar un papel

determinante en la regulación positiva o negativa de las vías de señalización de INF y de algunos otros ISGs. [20-22]

Gen de la proteína inducible por INF- γ (IP10)

El gen IP10 codifica para la proteína inducible por IFN- γ (IP10) también le llaman ligando de la quimiocina 10 (CXCL10), forma parte de un subgrupo de citocinas llamadas quimiocinas. Este subgrupo regula la migración leucocitaria a los sitios de infección o a los nodulos linfáticos y la activación de leucocitos, diferenciación, regulación del balance Th1/Th2, angiogénesis y fibrogénesis [23]. De manera particular IP10 atrae células mononucleares y recluta linfocitos T CD8+ a los hepatocitos infectados causando inflamación hepática, fibrosis y daño hepatocelular [24].

Gen 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (OAS2)

El gen OAS2 forma parte de una familia de 4 genes (OAS1, OAS2, OAS3 y el gen parecido a 2'-5'-oligoadenilato sintetasa o OASL) que codifica para la familia de proteínas 2'-5'-oligoadenilato sintetetas (2'-5' OAS) las cuales forman parte de las primeras enzimas antivirales caracterizadas. Las enzimas 2'-5' OAS se inducen por IFN tipo I y II y se activan por ARN de doble cadena (dsRNA) presente en alguna etapa del ciclo de algunos virus. La activación permite la formación de oligoadenilatos de ATP con un enlace 2'-5' y la liberación de pirofosfato. A su vez, estos oligoadenilatos se unen a la enzima ARNasa L para su activación que se manifiesta por la degradación del ARN celular y viral, se suprime la síntesis proteica y el crecimiento viral (figura 3). Además, las proteínas OAS están involucradas en la inducción de apoptosis y el crecimiento celular.

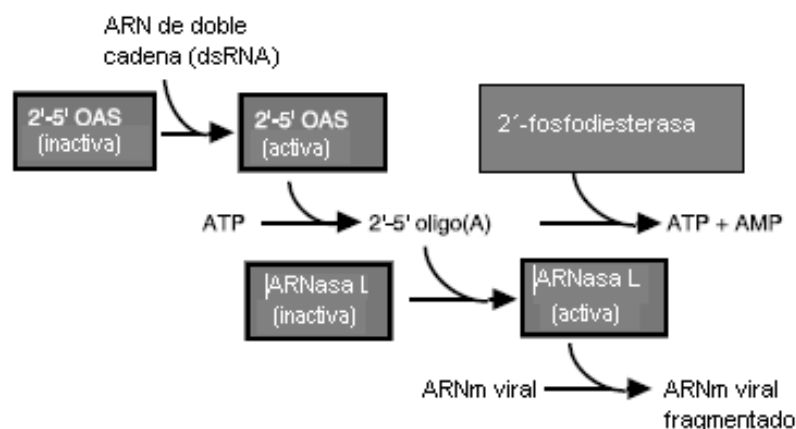


Figura 3. Degradación de ARN viral por la formación de oligoadenilatos. Modificado de Han y Barton, 2002.

Gen supresor de señalización citocinas 3 (SOCS3)

El gen SOCS3 codifica para la proteína supresora de señalización por citocinas 3, la cual pertenece a una familia de ocho miembros (SOCS1-7 y una proteína que contiene un dominio SH2 con homología a SRC inducida por citocinas o CIS). Esta familia fue descubierta en la regulación negativa de la vía de señalización pleiotrópica Jak-Stat sin embargo, diversos estudios comprueban que además suprimen la señalización de TLRs, regulan la activación de células dendríticas, macrófagos y que son esenciales para el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos T [25]. La estructura de cada miembro consiste en tres regiones, una región amino terminal variable, un dominio central SH2 y una caja SOCS en el extremo carboxilo. Esta familia de proteínas suprime vías de señalización mediante la caja SOCS que funciona como una ligasa (E3) en el proceso de degradación proteica por ubiquitinación, el dominio SH2 hace que la degradación de distintas proteínas sea específica. Además el dominio SH2 de SOCS3 permite la unión a las proteínas JAK, como se muestra en la figura 3, para posteriormente impedir la señalización de la vía Jak-STAT mediante una región inhibidora de cinasas (KIR).

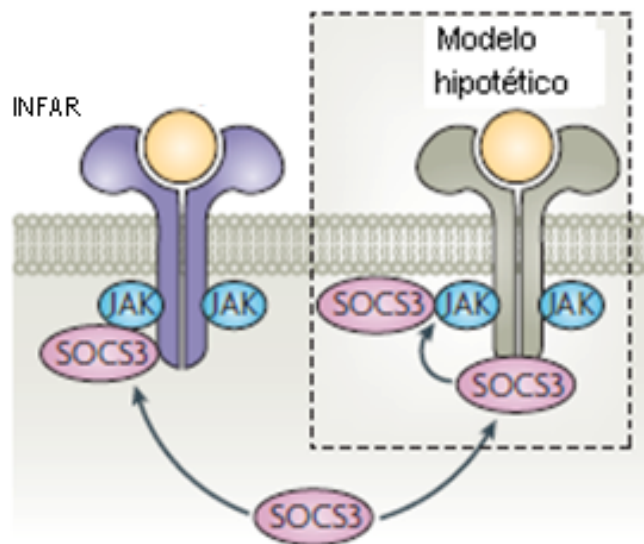


Figura 4. Rol del dominio SH2 en SOCS3. SOCS3 se une a las proteínas JAK y en un modelo hipotético también podría interactuar primero con el receptor y después con las proteínas JAK. IFNAR, receptor de IFN tipo I. Modificado de Yoshimura, Naka y Kubo, 2007.

INF α como tratamiento en pacientes infectados con VHC y su relación con la expresión de ISGs.

La hepatitis C crónica se trata con INF α recombinante unido a una molécula de polietilenglicol (pegINF α) la cual aumenta el tiempo de vida media del fármaco. Actualmente existen dos isoformas de pegINF α que se administran por vía subcutánea, pegINF α -2a en una dosis de 180 μ g/semana y pegINF α -2b en una dosis de 1.5 μ g/kg de peso corporal/semana. Su mecanismo de acción se basa en el efecto antiviral del INF antes descrito.

Los efectos colaterales más comunes son fiebre, cefalea, fatiga, artralgia y mialgia que se presentan al inicio del tratamiento y por lo general ceden después de las primeras aplicaciones y no requieren ajuste de la dosis. En caso de aparecer los siguientes efectos adversos severos se modifica o suspende tratamiento:

1. Alteraciones neuropsiquiátricas como depresión, irritabilidad, confusión, delirio, ataxia extrapiramidal (descoordinación en el movimiento), parestesia (sensación de hormigueo) y convulsiones [26, 27].
2. Alteraciones hematológicas como leucopenia, plaquetopenia o anemia.
3. Desarrollo de fenómenos autoinmunitarios como tiroiditis autoinmunitaria, que se manifiesta como hipotiroidismo o hipertiroidismo, hepatitis autoinmunitaria y lupus eritematoso sistémico.
4. Otras. Cirrosis biliar, arritmia cardíaca, insuficiencia renal, fibrosis pulmonar, retinopatía y pérdida de la audición [28].

De forma complementaria se administran dos veces al día vía oral 800–1200 mg de ribavirina un análogo de la guanósina, por su amplio espectro de actividad contra varios virus. Aún no se conoce con precisión su modo de acción, pero es probable que su actividad antiviral se deba a la inhibición de la estructura 5' cap del ARN mensajero y de las ARN polimerasas. El efecto colateral más importante que provoca es hemólisis, la cual puede ocasionar un decremento entre el 10 al 20 % en los niveles de hemoglobina. Los pacientes con requerimientos claros del tratamiento, son aquellos con hepatitis C crónica que presentan fibrosis así como un incremento y persistencia en los niveles de alanino-aminotransferasa (ALT) y aspartato-aminotransferasa (AST) en sangre.

La duración del tratamiento depende de la carga viral inicial y del genotipo del VHC. El tratamiento en pacientes infectados con VHC genotipo 1 ó 4 dura 48 semanas y 24 semanas en aquellos con VHC genotipo 2 o 3. Durante el tratamiento se evalúa la carga viral y dependiendo de ésta se han establecido deficiencias en la respuesta al tratamiento que se mencionan en la tabla 3.

Tabla 3. Definiciones de la respuesta al tratamiento.

Respuesta viral rápida (RVR)	ARN del VHC indetectable en la semana 4 de tratamiento.
Respuesta viral temprana (EVR)	Reducción del ARN del VHC $> 2 \log_{10}$ en la semana 12 de tratamiento o ARN del VHC indetectable después de 12 semanas de tratamiento.
Sin respuesta primaria (PNR)	Disminución menor a $2 \log_{10}$ en la carga viral después de 12 semanas de tratamiento.
Respuesta al finalizar el tratamiento (EoTR)	ARN del VHC indetectable al finalizar el tratamiento.
Sin respuesta al tratamiento (NR)	ARN del VHC detectable al finalizar el tratamiento.
Respuesta virológica sostenida (RVS)	ARN del VHC indetectable después de 6 meses de EoTR.
Recaída	ARN del VHC detectable al finalizar el tratamiento

Al finalizar el tratamiento y 6 meses después se realizan PCRs para detectar la presencia del virus. El objetivo es que el ARN del VHC sea indetectable es decir, que se establezca una respuesta virológica sostenida (RVS). Sin embargo, la RVS solo se alcanza en un 50% de pacientes infectados con genotipo 1, 80% con genotipo 2 o 3 y de 60 a 70% con genotipo 4 [29]. Por tanto, se han buscado las razones por las cuales existe una falta de respuesta al tratamiento en un porcentaje importante de los pacientes, así como la identificación de marcadores biológicos que puedan predecir que pacientes son candidatos a recibir la terapia combinada de pegINF+rib.

ANTECEDENTES

Los marcadores biológicos que en un principio se relacionaron con la falta de respuesta al tratamiento fueron carga viral basal alta (> 2 millones de copias/ml), fibrosis hepática en etapas avanzadas, género masculino, mayor a 50 años, obesidad, ingesta de alcohol elevada, resistencia a la insulina, esteatosis hepática, etc[29]. Sin embargo, estos factores no ayudaron a predecir la respuesta al tratamiento positiva o negativa de los pacientes con VHC. Posteriormente, se investigó que genes se expresaban por la administración de INF a través del tiempo, algunos de los estudios se realizaron en biopsias de hígado y otros con células mononucleares de sangre periférica (PBMC's). En general, se encontró que había genes relacionados con la cascada de señalización de INF o incluso genes que se inducen por INF como los ISGs, que se encontraban activos antes y después de la administración del INF. En otras palabras, la expresión de algunos genes se inducía mientras que en otros pasaba lo contrario.

En el 2005, Chen *et al.* comparó la expresión de distintos genes en biopsias de hígado de pacientes RVS y NR y encontró diferencias en los perfiles de expresión de distintos genes entre ambos grupos [30]. Los pacientes NR presentaron la sobreexpresión de 18 genes, la mayoría ISGs, en muestras pre-tratamiento. Posteriormente, distintos grupos de investigación realizaron estudios similares y confirmaron que los pacientes NR eran aquellos con alta expresión de ISGs antes del tratamiento[31-33]. La mayoría de los estudios publicados se han realizado en biopsias de hígado y existen pocos estudios con PBMCs. Lanford *et al.* comparó la expresión de ISGs en biopsias de hígado y PBMCs de chimpancés sanos después de la administración de INF y reportó ISGs que se expresaron solamente en hígado, otros genes que se expresaron solamente en PBMCs y los que se expresaron tanto en hígado como en PBMCs, entre estos últimos se encuentran el gen inducido por interferón-15 (ISG15), el gen 2'-5-oligoadenilato sintetasa 2 (OAS2), el gen de la proteína inducida por INF- γ (IP-10) y el gen supresor de señalización por citocinas 3 (SOCS3) [34]. Sarasin-Filipowicz *et al.*, comparó la expresión de ISGs en biopsias de hígado y PBMCs de RVS y pacientes NR antes del tratamiento y cuatro horas después; los resultados mostraron que los NR tenían mayor expresión de ISGs antes y después del tratamiento, por otro lado, los RVS presentaron niveles de expresión bajos de ISGs antes del tratamiento que incrementaron después de la administración de INF; con respecto a PBMCs, los niveles de expresión de los ISGs se indujeron tanto en RVS como en NR después del tratamiento con la diferencia de que en NR los valores de expresión fue menor antes del tratamiento [32]. Por otra parte, otros grupos de investigación corroboraron la expresión diferencial de ciertos ISGs en RVS y PNR al tratamiento con IFN, en base a los hallazgos de Chen, et al.

Posteriormente, crearon modelos matemáticos que aplicaron a un grupo de pacientes para predecir su respuesta al tratamiento con pegINF+rib y se demostró su expresión diferencial [31, 35-38]. En resumen, estos trabajos proponen a los genes ISG15, OAS2, IP10 y SOCS3 como genes candidatos a predecir la respuesta al tratamiento con pegINF+rib en pacientes con VHC. Adicionalmente, estos hallazgos se corroboraron en biopsias hepáticas de pacientes NR antes del tratamiento, dónde se observó la sobreexpresión de los cuatro genes a nivel de ARNm [30, 32, 33, 36, 38-41].

Complementariamente, los trabajos que refieren la expresión y funcionalidad de las proteínas que codifican estos genes en pacientes infectados con VHC que responden o no al tratamiento son escasos. Un reporte propone que la proteína del gen ISG15 puede promover la replicación del VHC y sugiere que el virus la utiliza como un mecanismo de evasión, lo que explicaría la relación entre la sobreexpresión de este gen en biopsias de hígado y la subsecuente falla en el tratamiento [30, 42] [38]. En cuanto a la actividad enzimática de la proteína sérica 2'-5'OAS en pacientes NR y RVS, se observó que no hay diferencias significativas entre ambos grupos, sin embargo otros estudios reportaron una mayor actividad de 2'-5'OAS en pacientes NR. También hay controversia en los cambios de la actividad de 2'-5'OAS a través del tiempo después del tratamiento, algunos reportes se demostró que los pacientes RVS aumentan la actividad enzimática y otros reportan que no hay diferencia [43-46]. La expresión de la proteína IP10 antes del tratamiento presenta niveles séricos elevados en pacientes con hepatitis C crónica con respecto a los controles sanos [47-51] o en pacientes NR con respecto a los RVS; después del tratamiento los pacientes RVS presentan una reducción del ARNm y su proteína sérica, con respecto a voluntarios sanos, sin embargo los niveles séricos de la proteína permanecen iguales antes y después del tratamiento en los pacientes NR [47-49, 52]. Recientemente, se reportó que la proteasa dipeptidilpeptidasa IV (DPP4) corta dos aminoácidos en la región amino terminal de la proteína IP10 para formar una proteína antagonista que compite con la unión al receptor CXCR3 para inhibir la señalización, lo anterior justificaría porque la sobreexpresión de IP10 se relaciona con pacientes con hepatitis C que no responden al tratamiento [53].

JUSTIFICACIÓN

La infección por el VHC es un problema importante de salud pública. El tratamiento más efectivo para estos pacientes es la combinación de interferón pegilado con ribavirina, sin embargo del 30-40% de pacientes no responde al tratamiento, lo que representa un problema importante a nivel mundial y en particular en la Unidad de Gastroenterología del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional siglo XXI. Este problema ha motivado que diversos grupos de investigación propongan genes que puedan predecir la respuesta al tratamiento, específicamente el gen regulador SOCS3 y los ISGs (ISG15, IP10, OAS2) se han estudiado en biopsias de hígado, sin embargo también pueden expresarse en células mononucleares de sangre periférica sin que existan reportes al respecto. Por lo anterior, el presente trabajo evaluó la expresión y correlación lineal de los genes propuestos en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con hepatitis C, con la finalidad de diferenciar aquellos pacientes que potencialmente puede responder o no al tratamiento con pegINF α +ribavirina.

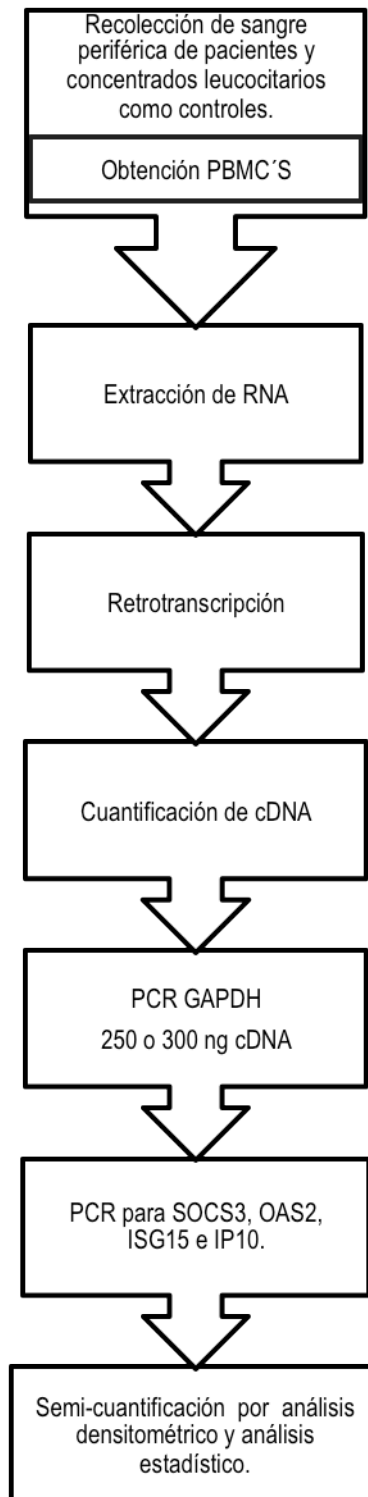
HIPÓTESIS

- La expresión en sangre periférica de los genes de respuesta a interferon (OAS2, IP10 e ISG15) y de SOCS3 individualmente o en correlaciones lineales pueden diferenciar a los pacientes infectados con VHC que responden de los que no al tratamiento con INF.

OBJETIVO

Evaluar la expresión en células mononucleares de sangre periférica del gen regulador SOCS3 y de los genes de respuesta a interferón (OAS2, IP10 e ISG15) así como realizar correlaciones lineales entre la expresión de estos genes para determinar si pueden diferenciar a los pacientes infectados con VHC que responden de los que no al tratamiento con INF.

METODOLOGÍA



Pacientes y controles

Se incluyeron 27 muestras de sangre periférica de pacientes infectados con VHC que acudieron a la consulta externa de la Unidad de Gastroenterología del Hospital de Especialidades del CMN siglo XXI, de los cuales veinte presentaron el genotipo 1 del VHC y siete el genotipo 2 determinado por el mismo departamento. Se tomó una primera muestra de sangre antes de iniciar el tratamiento con pegIFN α +rib y una segunda muestra durante el tratamiento alrededor del tercer mes. Los controles fueron concentrados leucocitarios de individuos sanos procedentes del banco de sangre del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Se utilizó una parte de Ficoll Hypaque (SIGMA, USA) y tres partes de sangre total diluida 1:1 con PBS 1X (NaCl 13,7 mM, KCl 0,27 mM, Na₂HPO₄ 1,0 mM, KH₂PO₄ 0,2 mM, pH = 7.4) tanto de pacientes como de controles. Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm por 30 min, las PBMC's se recolectaron con pipeta Pasteur y se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación a 1500 rpm por 10 min. Las células se contaron en cámara de Neubauer, se tomaron de 1 a 10 millones de PBMC's para su homogenización con trizol y se congelaron a -70°C hasta su uso.

Extracción de ARN total con Trizol

Las muestras descongeladas se calentaron a 65 °C por 6 min, se agregaron 200 μ L de cloroformo (SIGMA, USA) y se incubaron por 15 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 12,000 x g por 15 min a 4 °C, se recolecta la fase acuosa, se agregó el mismo volumen de isopropanol (SIGMA, USA) y se guardaron a -20°C toda la noche. Después se centrifugaron a 12,000 x g por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, se agregaron 500 μ L de etanol al 75 % (SIGMA, USA) y se centrifugaron a 7500 x g por 5 min a 4 °C dos veces, se eliminó el sobrenadante y se secó con vacufuga. Los botones de ARN se resuspendieron e hidrataron 2 horas en 25 μ L de agua grado biología molecular (SIGMA, USA).

El RNA se cuantificó y determinó su pureza por la relación de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm en un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA), la integridad del ARN se determinó en un gel de agarosa al 1%.

Síntesis de cDNA por retrotranscripción del ARN total

La síntesis de cDNA se realizó con el kit High Capacity cDNA Retrotranscription Kit (Applied Biosystems), se emplearon 1.5 μ g de ARN para concentraciones > 150 ng/ μ L en 10 μ L de solución

y 10 μL de ARN para concentraciones $\leq 150 \text{ ng}/\mu\text{L}$. A la solución de ARN se le agregaron 10 μL de la mezcla de reacción: 2.0 μL de Buffer RT 10X, 0.8 μL de MixdNTP 25X (100 mM), 2.0 μL de cebadores aleatorios 10X, 1.0 μL de Transcriptasa reversa Multiscribe, 4.2 μL de agua grado biología molecular (SIGMA, USA).

La reacción se realizó en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) y se empleó el siguiente programa de retrotranscripción: un ciclo de 10 min a 25 °C, un ciclo de 120 min a 37 °C, un ciclo de 5 seg a 85 °C y se mantuvo a 4°C. Al término de la reacción el cDNA se cuantificó en el Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

Prueba de control de calidad del cDNA

Se hicieron diluciones que contenían 250 ng de cDNA para la amplificación del gen gliceralhído-3-fosfato (GAPDH) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mezcla de reacción se ajustó a 10 μL utilizando 6,85 μL de agua grado biología molecular (SIGMA, USA), 1 μL de buffer de NH_4SO_4 (Fermentas), 0,2 μL de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies), 0,2 μL de deoxinucleótidos (dNTPs, Fermentas) y 0,15 μL de la enzima Taq polimerasa 5U/ μL (Fermentas). La reacción se realizó en el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) con el programa de amplificación: 1 ciclo a 94 °C por 3 min; un ciclo de 94 °C por 35 seg, 28 ciclos a 59 °C por 30 seg, un ciclo de 72 °C por 30-40 seg y un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C. Se incluyó un control negativo donde se sustituyó agua en lugar de cDNA como control de calidad de reacciones cruzadas. Los productos de amplificación del PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% post-teñidos con Midori (Nippon Genetics Europe), a 75 V en amortiguador TBE 1X (89mM Tris base, 89mM ácido bórico, 2 mM EDTA; pH= 8,3). En las muestras que no amplificaron se aumentó la cantidad de cDNA a 300 o 400 ng.

Amplificación de cDNA para los genes SOCS3, OAS2, IP10 e ISG15

La cantidad de cDNA que se empleó para la amplificación de GAPDH también se empleó para los genes SOCS3, OAS2, IP10 y 1.4 veces más en el caso de ISG15. La mezcla de reacción se compuso de 0,15-0,2 μL de cada oligonucleótido 10 mM (Integrated DNA Technologies), 1 μL de amortiguador de NH_4SO_4 o KCl (Fermentas o Invitrogen), 0,2-0,4 μL de MgCl_2 50 mM (Fermentas), 0,15 μL de enzima Taq polimerasa 5U/ μL (Fermentas) como se muestra en el anexo I, tabla a. Se utilizó el programa de amplificación para GAPDH con las temperaturas y tiempos de hibridación del anexo I, tabla b.

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% por 90 minutos a 85 V. Los geles preteñidos con Midori (Nippon Genetics Europe) se visualizaron y capturaron con el Molecular Imager Gel Doc XR+ (Bio-rad, USA), y se cuantificó densitométricamente con el programa Quantity One. Las muestras que no amplificaron los genes de estudio se doblaron la cantidad de cDNA sin variar la cantidad de cDNA para GAPDH. La expresión relativa de cada gen se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\frac{\text{Densitometría en gen problema}}{\text{Cantidad del gen problema}}}{\frac{\text{Densitometría de GAPDH}}{\text{Cantidad de GAPDH}}}$$

Análisis estadístico

Se empleó el programa GraphPrism para el análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico Kruskal-Wallis y posteriormente, se realizó la prueba de Dunn para saber entre cuales grupos había diferencia significativa ($P < 0.05$). Para determinar si existía correlación se realizó la prueba de Spearman con el mismo programa. En la relación SOCS/ISG15 se empleó prueba de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Consideraciones éticas

En el presente estudio se mantuvo en anonimato a todos los participantes implicados en la investigación y se siguieron las normas éticas de la declaración de Helsinki revisada en octubre del 2000 en Edinburgo.

RESULTADOS

Se evaluaron 20 pacientes infectados crónicamente con el VHC genotipo 1, los cuales por sus características clínicas fueron candidatos a iniciar tratamiento con pegINF α +rib, se les determinó la carga viral antes de iniciar el tratamiento así como a la semana 12. En la tabla 4 se muestran las características generales de los pacientes como edad la cual en promedio es de 49 años, 6 pacientes son de género masculino y el resto femenino. Los resultados de carga viral indican que a la semana 12 de tratamiento 15 pacientes, es decir el 75 % (figura 5), presentaron una disminución de $2\log_{10}$ de la carga viral basal o no presentaron carga viral, por lo que para este trabajo fueron considerados como pacientes con respuesta viral temprana (EVR). El 25% restante de acuerdo a los valores de carga viral se consideraron sin respuesta primaria al tratamiento (PNR).

Además se evaluaron 7 pacientes con VHC genotipo 2 (tabla 5). En estos pacientes la edad en promedio es de 55 años, 2 pacientes son de género masculino y el resto femenino. En estos pacientes el 71% se consideraron como EVR y el 29% restantes se consideraron como PNR (figura 6). Además en el estudio se incluyeron controles sanos de banco de sangre negativos para el VHC.

Tabla 4. Características del paciente y la respuesta al tratamiento en la semana 12 de los pacientes infectados con VHC genotipo 1.

Paciente	Edad	Género	Genotipo	Carga viral (log ₁₀ UI/ml)	Carga viral (log ₁₀ UI/ml)	Carga viral (log ₁₀ UI/ml)	Respuesta al tratamiento en
				Basal	semana 4	semana 12	semana 12
3	22	F	1b	5,35	NA	indetectable	EVR
7	57	F	1b	6,21	NA	indetectable	EVR
9	33	M	1a	5,46	6,11	indetectable	EVR
10	44	M	1a	5,4	4,12	3,79	PNR
14	45	M	1a	6,47		indetectable	EVR
17	62	F	1a	6,12	4,35	3,77	EVR
21	66	F	1b	5,2	indetectable	indetectable	EVR
23	54	F	1b	4,13	4,23	1,82	EVR
25	46	F	1a	5,72	NA	NA	PNR
27	46	M	1a	6,53	5,99	NA	PNR
29	64	F	1a	4,22	indetectable	indetectable	EVR
31	64	F	1a	5,88	indetectable	indetectable	EVR
32	50	F	1b	5,57	4,4	indetectable	EVR
33	63	M	1b	6,19	NA	NA	PNR
35	51	F	1b	5,34	4,96	NA	PNR
36	45	F	1	4,76	indetectable	indetectable	EVR
38	48	M	1a, 4f	5,82	indetectable	indetectable	EVR
39	34	F	1	5,48	5,03	2,6	EVR
40	42	F	1a	5,48	4,35	indetectable	EVR
41	52	F	1a	5	indetectable	indetectable	EVR

M. masculino; F, femenino; NA, no aplica ya que no se realizó la prueba; EVR, respuesta viral temprana; PNR, sin respuesta primaria.

Respuesta al tratamiento en semana 12

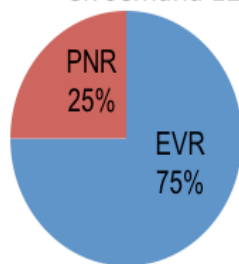


Figura 5. Respuesta al tratamiento con peg-IFN α +ribavirina en pacientes infectados con genotipo de VHC 1 en semana 12.

Tabla 5. Edad, género, carga viral y la respuesta al tratamiento en la semana 12 de los pacientes infectados con VHC genotipo 2.

Paciente	Edad	Género	Genotipo	Carga viral (log ₁₀ UI/ml)	Carga viral (log ₁₀ UI/ml)	Carga viral (log ₁₀ UI/ml)	Respuesta al tratamiento en
				basal	semana 4	semana 12	semana 12
2	54	M	2a/2c	3,92	indetectable	NA	EVR
12	38	M	2	5,49	NA	NA	EVR
13	63	F	2b	5,07	indetectable	indetectable	EVR
16	51	F	2a/2c	5,68	indetectable	NA	EVR
20	69	F	2b	6,09	2,35	NA	PNR
34	58	F	2a/2c	6	4,16	NA	PNR
37	51	F	2b	6,28	NA	2,11	EVR

M, masculino; F, femenino; NA, no aplica ya que no se realizó la prueba; EVR, respuesta viral temprana; PNR, sin respuesta primaria.

Respuesta al tratamiento
en semana 12

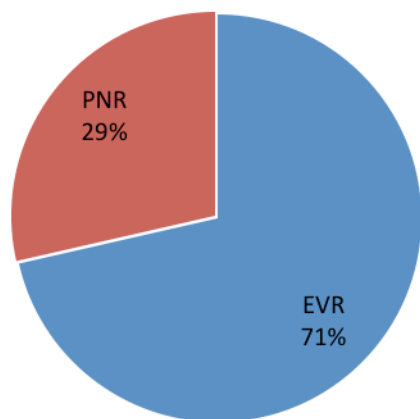


Figura 6. Respuesta al tratamiento con peg-IFN α +ribavirina en pacientes infectados con genotipo de VHC 2 en semana 12.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de los pacientes y de los controles mediante un gradiente de ficoll hypaque y a partir de aproximadamente 10×10^6 células se realizó extracción del ARN total, se llevó a cabo la síntesis de cDNA y se evaluó la expresión de ARNm de los genes SOCS3, ISG15, OAS2 e IP10.

En la figura 7 se muestra un gel representativo de agarosa al 2% de los productos de PCR de cada gen, por medio del análisis densitométrico de las bandas se determinó la expresión relativa del ARNm de los genes en base al gen de referencia Gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH).

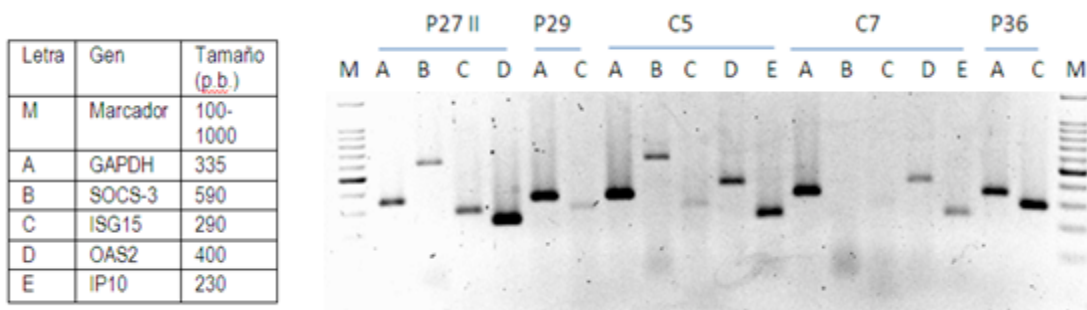


Figura 7. Gel de agarosa al 2% de productos de PCR de los genes GAPDH, SOCS3, ISG15, OAS2 e IP10 de tres pacientes (P27II, P29 y P36) y dos controles (C5 y C7). Se utilizaron 250 ng o 300 ng de cDNA para GAPDH, SOCS3, OAS2 e IP10 y 350 o 420 ng de cDNA para ISG15. Cuando no amplificaron los productos de PCR como en el caso de SOCS3 en el control 7, se empleó el doble de cDNA para dicho gen y 250 o 300 ng de cDNA para el gen control GAPDH. Se obtuvo la expresión relativa como se describió en la metodología.

Consecutivamente se graficó la expresión relativa del ARNm de cada gen en los controles y en los distintos grupos de pacientes. Los pacientes se dividieron en aquellos con respuesta viral temprana antes (EVR1) y después del tratamiento (EVR2), pacientes sin respuesta primaria antes (PNR1) y después del tratamiento (PNR2).

En las graficas siguientes se incluyeron los genotipos de VHC 1 y 2 para incrementar el tamaño de muestra al considerar que el porcentaje de respuesta al tratamiento fue similar en los dos genotipos y que además no se observaron diferencias importantes en la expresión de los genes al graficar los genotipos de manera independiente.

Al evaluar la expresión relativa del ARNm de SOCS3 se puede observar en la figura 8 que existe una tendencia que muestra mayor expresión en PNR1, la cual inclusive se mantiene después del tratamiento comparada con la expresión de ARNm en los controles sanos, EVR1 y EVR2.

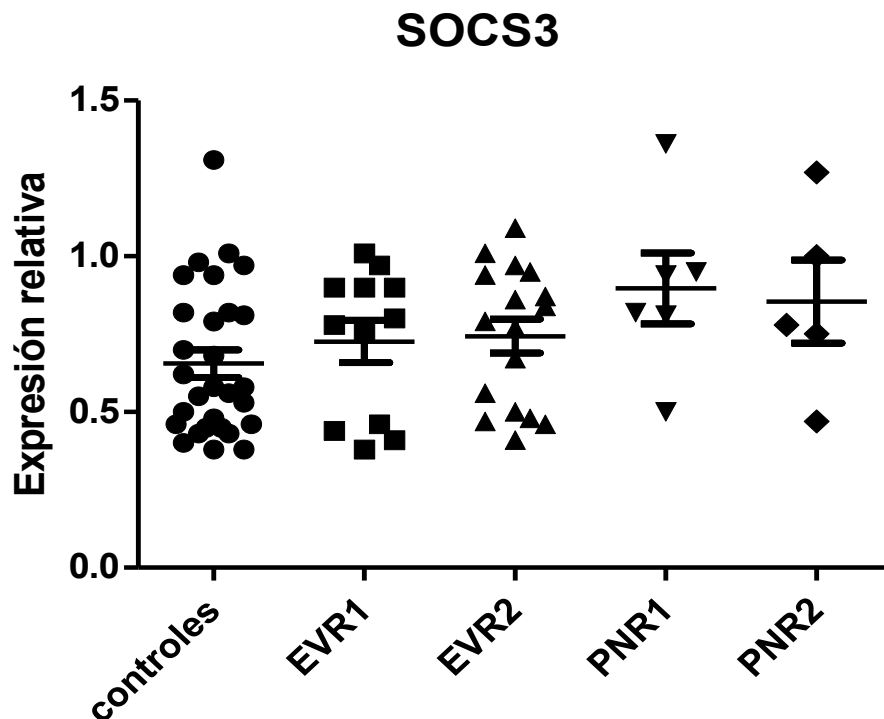


Figura 8. Expresión relativa de ARNm de SOCS3 en células mononucleares de sangre periférica de controles sanos y pacientes con hepatitis C con respuesta viral temprana antes y después del tratamiento (EVR1 y EVR2) y pacientes sin respuesta primaria antes y después del tratamiento (PNR1 y PNR2). Se realizó el ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$).

Al evaluar la expresión relativa del ARNm del gen IP10 en los distintos grupos no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes EVR1 y PNR1. Se observa una tendencia que muestra una mayor expresión de este gen después del tratamiento tanto en EVR2 como en los pacientes PNR2 y esta tendencia es ligeramente mayor en los EVR2 (Figura 9).

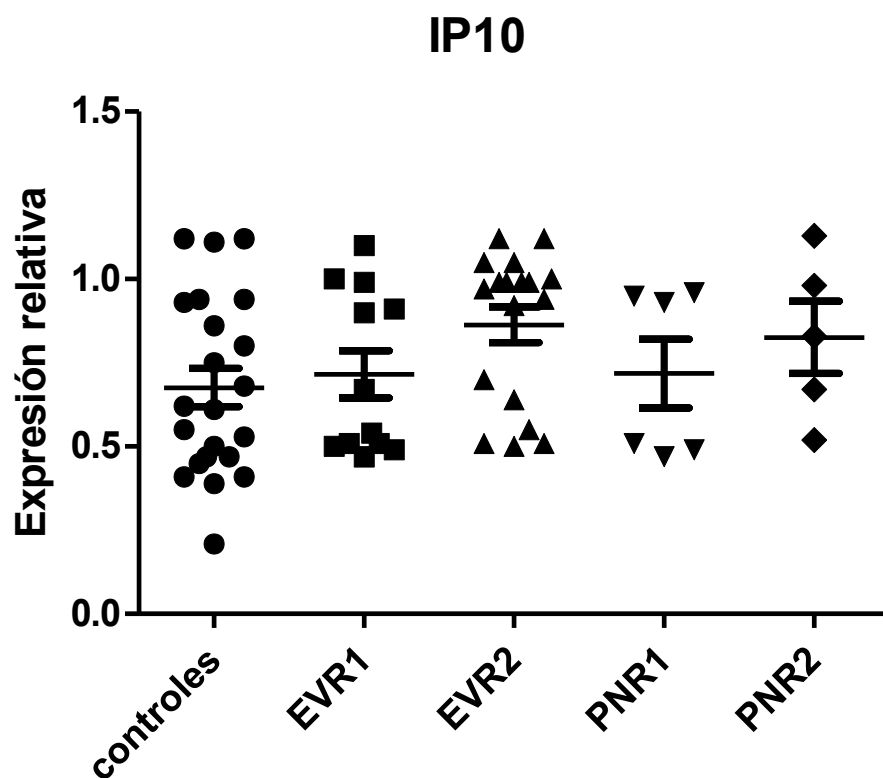


Figura 9. Expresión relativa de ARNm de IP10 en células mononucleares de sangre periférica de controles sanos y pacientes con hepatitis C con respuesta viral temprana antes y después del tratamiento (EVR1 y EVR2) y pacientes sin respuesta primaria antes y después del tratamiento (PNR1 y PNR2). Se realizó el ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis ($P < 0.05$).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los pacientes EVR2 con los individuos control en la expresión relativa de ARNm del gen ISG15. También se observaron diferencias significativas al comparar los pacientes EVR1 y EVR2 y entre EVR2 y PNR1. A pesar de que se observa una tendencia que indica una menor expresión del gen ISG15 en los pacientes PNR1 y PNR2 con respecto a los pacientes EVR esta no fue significativa. (Figura 10).

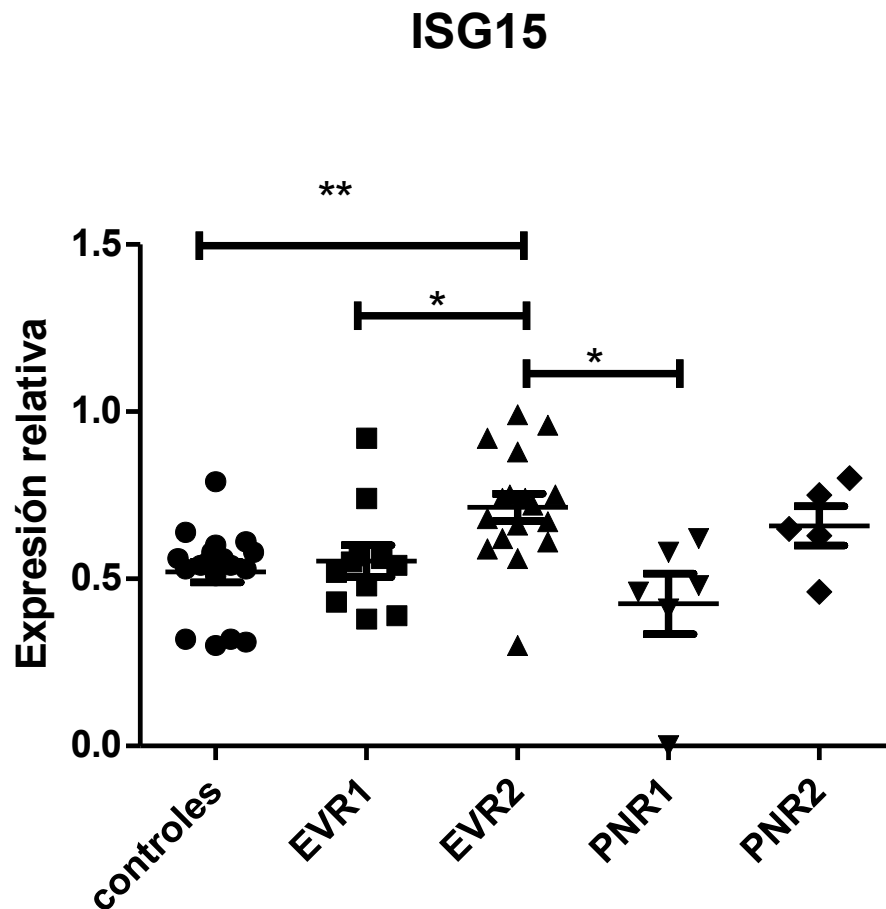


Figura 10. Expresión relativa de ARNm de ISG15 en células mononucleares de sangre periférica de controles sanos, pacientes con hepatitis C con respuesta viral temprana antes y después del tratamiento (EVR1 y EVR2) y pacientes sin respuesta primaria antes y después del tratamiento (PNR1 y PNR2). Se realizó ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

Al evaluar la expresión de OAS2 se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para ISG15, se observa una mayor expresión después del tratamiento tanto en los pacientes EVR2 como en PNR2. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del ARNm de este gen en los pacientes EVR2 con respecto a los controles y al comparar la respuesta antes y después del tratamiento entre los EVR2 contra PNR1. Se observa nuevamente una tendencia que indica menor expresión de OAS2 en los pacientes PNR1 con respecto a controles y a EVR1. La expresión de OAS2 también incrementa después del tratamiento en los pacientes PNR aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. (Figura 11).

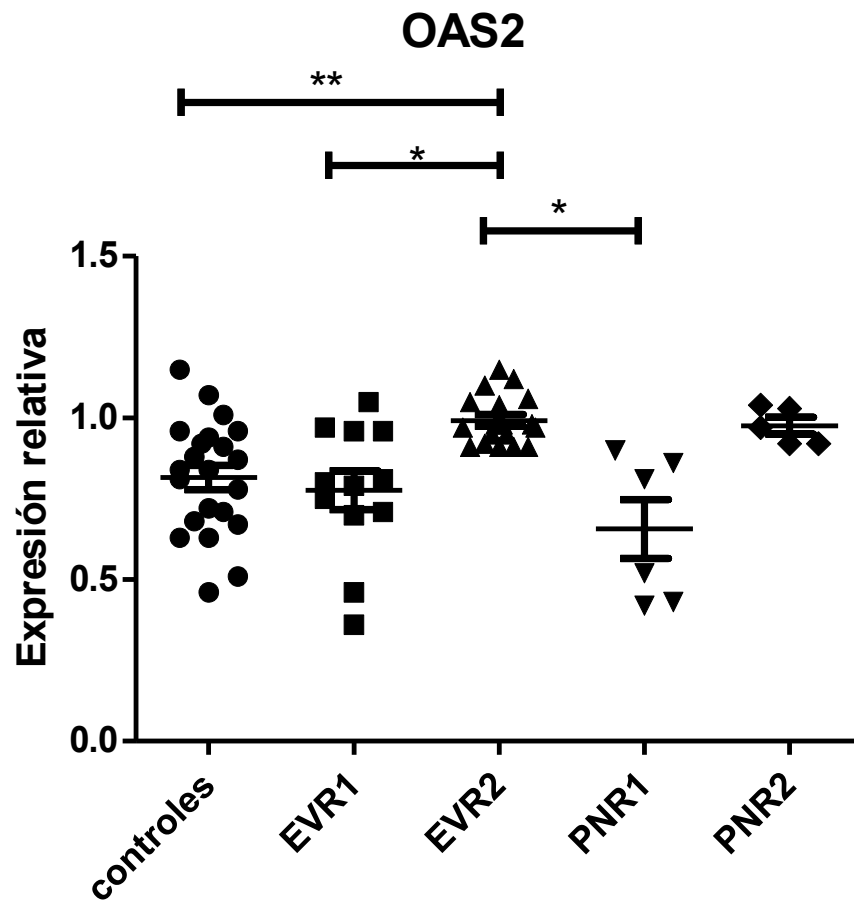


Figura 11. Expresión relativa de ARNm de OAS2 en células mononucleares de sangre periférica de controles sanos, pacientes con hepatitis C con respuesta viral temprana antes y después del tratamiento (EVR1 y EVR2) y pacientes sin respuesta primaria antes y después del tratamiento (PNR1 y PNR2). Se realizó ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis y prueba de Dunn ($P < 0.05$).

Con los mismos datos de expresión relativa del ARNm se llevó a cabo la correlación lineal entre los distintos genes para evaluar su posible relación. De manera interesante existe una correlación lineal positiva fuerte entre la expresión de ISG15 y OAS2 en los pacientes EVR1 (figura 12). Esta correlación positiva también se observó cuando se analizaron las muestras de los pacientes EVR2 (Figura 13). No se observó correlación en los pacientes PNR.

Correlación ISG15 y OAS2 en EVR1

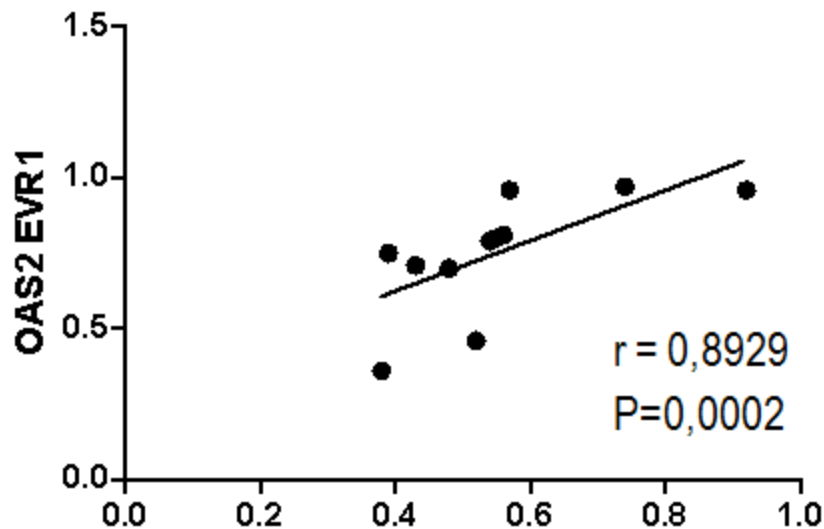


Figura 12. Correlación lineal no paramétrica entre la expresión relativa de ARNm de OAS2 e ISG15 en pacientes con respuesta viral temprana antes del tratamiento (EVR1).

Correlación ISG15 y OAS2 en EVR2

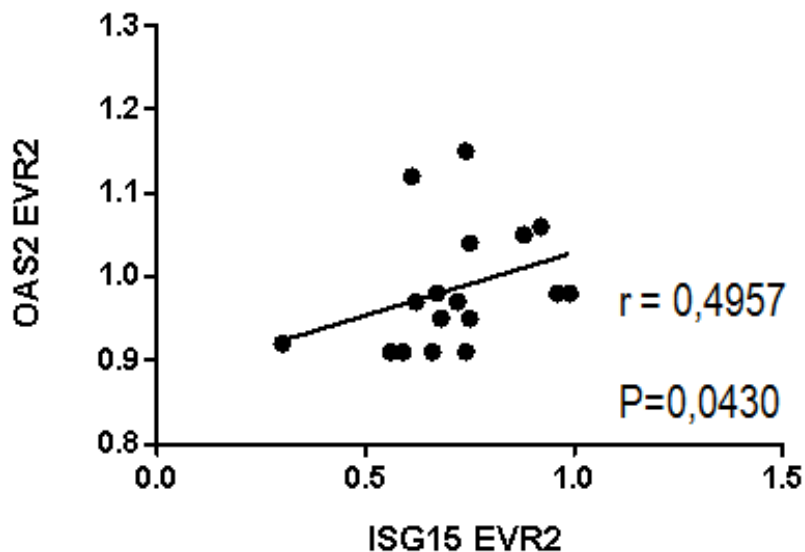


Figura 13. Correlación lineal no paramétrica entre la expresión relativa de ARNm de OAS2 e ISG15 en pacientes con respuesta viral temprana después del tratamiento (EVR2).

Al evaluar la correlación entre SOCS3 y OAS2 nuevamente se observó una correlación lineal positiva fuerte en los pacientes EVR1 y no se observó correlación en los pacientes después del tratamiento ni en PNR. (Figura 14).

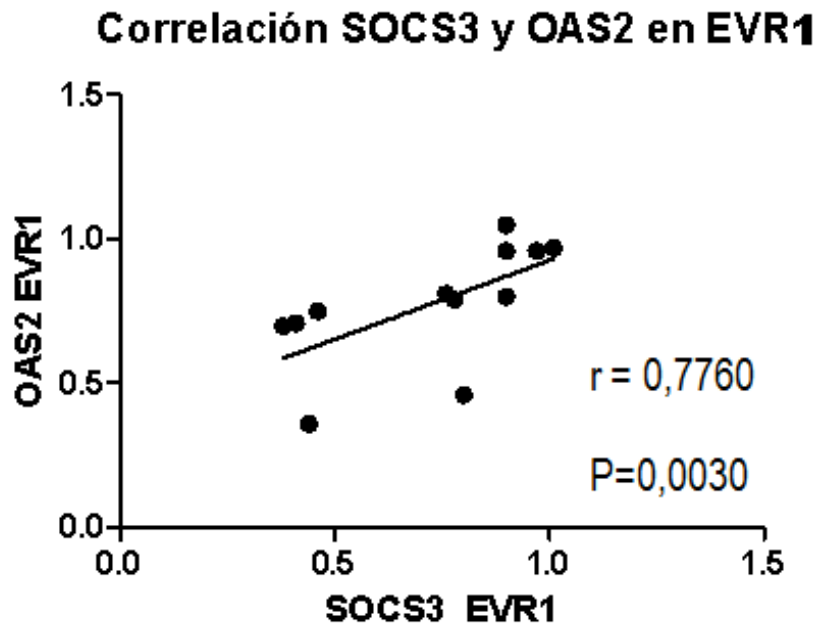


Figura 14. Correlación lineal no paramétrica de la expresión relativa de ARNm de OAS2 y SOCS3 en pacientes con respuesta viral temprana antes del tratamiento (EVR1).

En la figura 15 se observa una correlación lineal positiva fuerte entre la expresión de SOCS3 e ISG15 en pacientes EVR1 y una correlación moderada en los pacientes EVR2 (figura 16). En contraste, en la figura 17 se observa una correlación lineal negativa en la expresión de SOCS3 e ISG15 en pacientes PNR1. Estos resultados indican una correlación diferencial entre la expresión de estos dos genes en pacientes EVR1 y PNR1 en la cual la expresión de SOCS3 en los pacientes PNR se relaciona a una menor expresión de ISG15.

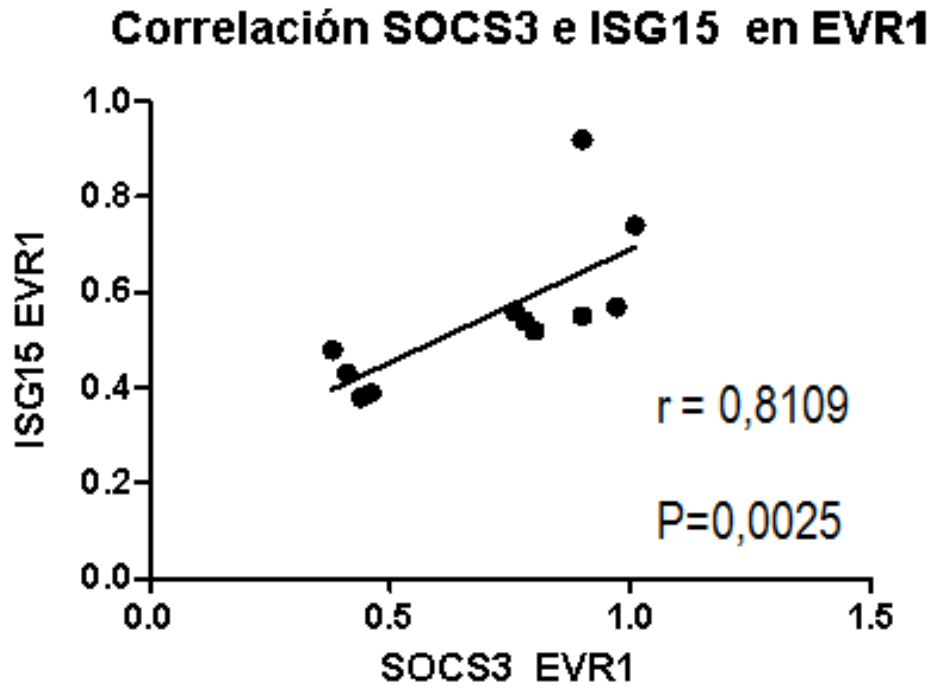


Figura 15. Correlación lineal no paramétrica entre la expresión relativa de ARNm de SOCS3 e ISG15 en pacientes con respuesta viral temprana antes del tratamiento (EVR1).

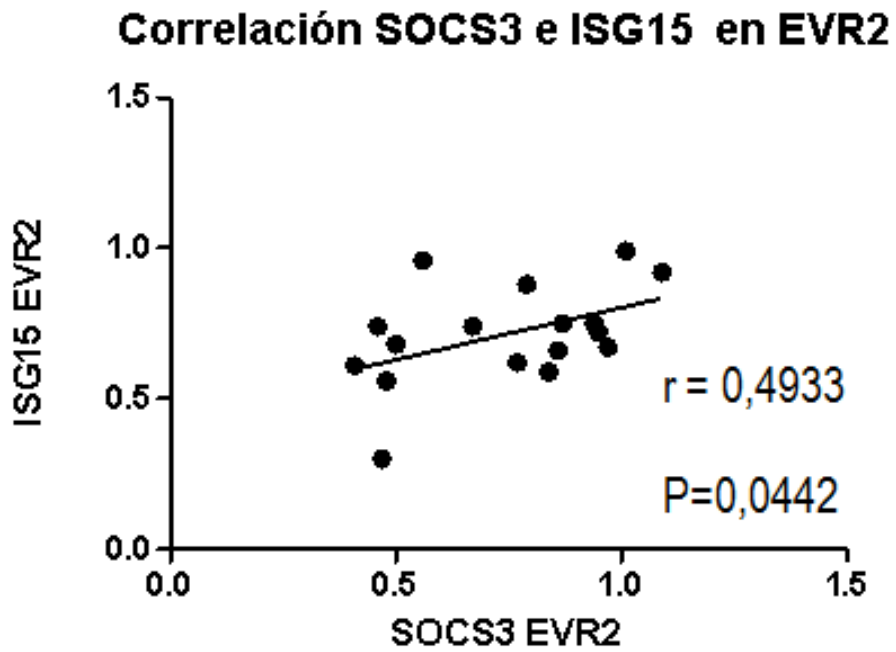


Figura 16. Correlación lineal no paramétrica entre la expresión relativa de ARNm de SOCS3 e ISG15 en pacientes con respuesta viral temprana después del tratamiento (EVR2).

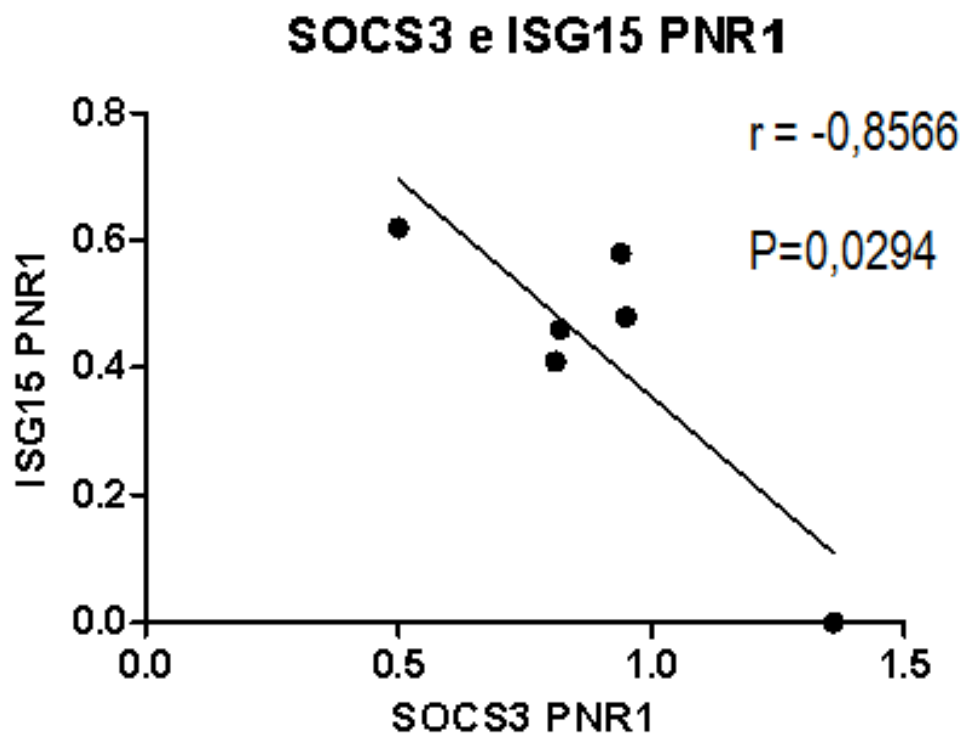


Figura 17. Correlación lineal paramétrica de la expresión relativa de ARNm de ISG15 y SOCS3 en pacientes sin respuesta primaria antes del tratamiento (PNR1).

Posteriormente los datos de expresión relativa de SOCS3 se dividieron entre los valores de cada ISG (OAS2, IP10, ISG15) en cada grupo de pacientes (EVR1, EVR2, PNR1 y PNR2) para determinar un valor numérico derivado de esta relación.

Como se observa en la figura 18, la relación SOCS3/OAS2 disminuye en los pacientes con respuesta viral temprana después del tratamiento y esta diferencia es estadísticamente significativa. De manera interesante se observa una tendencia en la cual la relación entre la expresión de SOCS3/OAS2 es mayor en los pacientes sin respuesta primaria al tratamiento alejándose de la unidad, esta relación disminuye después del tratamiento. Resultados similares fueron obtenidos al obtener la relación entre SOCS3/IP10 y entre SOCS3/ISG15 (figuras 19 y 20). En todos los casos la relación entre SOCS3 y los ISGs en los PNR disminuye después del tratamiento sin embargo, se mantiene elevada al compararla con la relación obtenida en los EVR después del tratamiento.

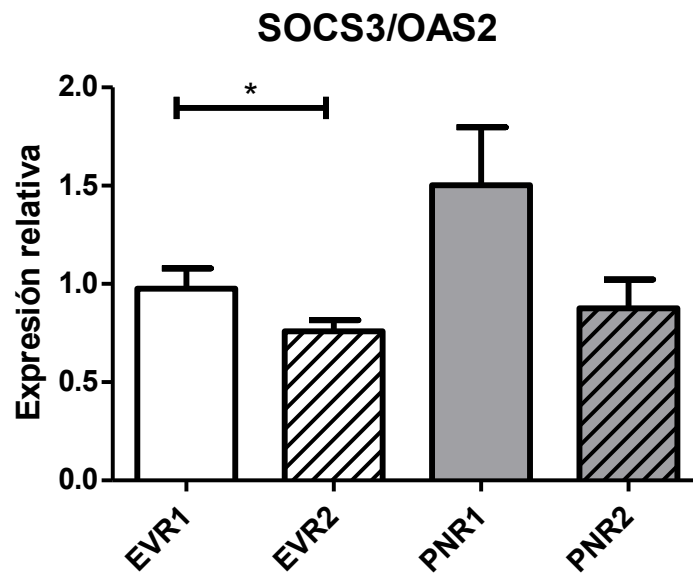


Figura 18. Relación SOCS3/OAS2 en pacientes con hepatitis C crónica. Se dividió la expresión relativa de SOCS3 entre OAS2 en pacientes con respuesta viral temprana antes (EVR1) y después del tratamiento (EVR2) y pacientes sin respuesta primaria antes (PNR1) y después del tratamiento (PNR2). Se realizó prueba de Mann-Whitney para detectar diferencias de medias por pares de grupo ($P < 0.05$).

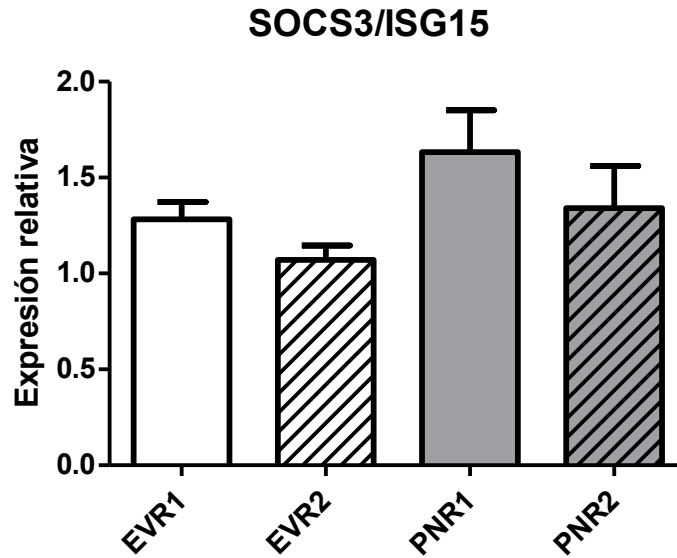


Figura 19. Relación SOCS3/ISG15 en pacientes con hepatitis C crónica. Se dividió la expresión relativa de SOCS3 entre ISG15 en pacientes con respuesta viral temprana antes (EVR1) y después del tratamiento (EVR2) y pacientes sin respuesta primaria antes (PNR1) y después del tratamiento (PNR2). Se realizó prueba de Mann-Whitney ($P < 0.05$) para detectar diferencias por pares de grupo.

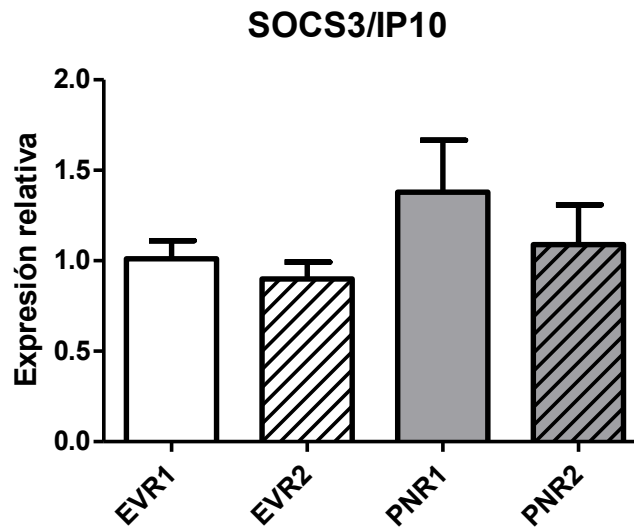


Figura 20. Relación SOCS3/IP10 en pacientes con hepatitis C crónica. Se dividió la expresión relativa de SOCS3 entre IP10 en pacientes con respuesta viral temprana antes (EVR1) y después del tratamiento (EVR2) y pacientes sin respuesta primaria antes (PNR1) y después del tratamiento (PNR2). Se realizó prueba de Mann-Whitney ($P < 0.05$) para detectar diferencias por pares de grupo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Inicialmente se determinó el porcentaje de pacientes que a la semana 12 de tratamiento presentaron respuesta viral temprana (EVR) o sin respuesta primaria (PNR). En los EVR no se detecta en sangre el VHC o la carga viral disminuye en $2\log_{10}$ a la semana 12 de tratamiento en comparación con el nivel basal y los PNR no responden a la semana 12 de tratamiento y se detecta el VHC [29]. Bajo este criterio, se obtuvo que el 75% y 71% de los pacientes infectados con VHC genotipo 1 y 2, respectivamente, presentaron respuesta viral temprana (EVR). En la literatura está reportado que entre el 50-60 % de los pacientes infectados con VHC genotipo 1 presentan respuesta viral sostenida (RVS) y pacientes con VHC genotipo 2 responden en un 70-80% [29]. En el caso de los pacientes con VHC genotipo 2 nuestros resultados concuerdan con la literatura, no así en los resultados obtenidos en los pacientes con VHC genotipo 1, donde la respuesta al tratamiento fue 10% más a lo reportado. La diferencia puede deberse a que nuestros resultados se compararon con la carga viral de la semana 12, con la posibilidad de que se vuelva a detectar el VHC en sangre 6 meses después que de haber finalizado el tratamiento, es decir que los pacientes tengan recaída y por tanto el porcentaje de respuesta al tratamiento disminuiría.

Posteriormente, se evaluó la expresión tanto de los ISGs como de SOCS3 y dado que no se observaron diferencias importantes al comparar a los pacientes con genotipo 1 y 2 se decidió incluir en el análisis ambos genotipos para incrementar el tamaño de la muestra. Sin embargo, sería importante incrementar el número de pacientes analizados para ambos genotipos y estudiarlos de manera independiente.

En cuanto a la expresión relativa de SOCS3 se observaron tendencias que muestran una mayor expresión relativa de este gen en las células mononucleares de sangre periférica en PNR antes y después del tratamiento. Este hallazgo concuerda con reportes que indican que el ARNm de SOCS3 presenta una mayor expresión en biopsias hepáticas de pacientes que no responden al tratamiento en comparación a controles sanos y a pacientes con respuesta viral sostenida (RVS) [39-41]. En este caso también sería importante incrementar el número de pacientes para determinar si este incremento es estadísticamente significativo así como evaluar la expresión de SOCS3 a nivel de proteína en células mononucleares totales de sangre periférica y en células que participan tanto en respuesta inmune innata y adaptativa ya que SOCS3 es una proteína que participa como regulador negativo en la vía de señalización de INF y en la vía de señalización de TLR3, entre otras, además de que existen reportes donde se correlaciona SOCS3 con una poca activación del sistema inmune innato y adaptativo lo cual podría pasar en este tipo de pacientes [25, 54, 55].

En el caso de IP10, no se observaron diferencias entre los pacientes EVR y PNR antes del tratamiento y se observó una mayor tendencia en la expresión del gen después del tratamiento tanto en EVR como PNR. Sin embargo, los resultados obtenidos para IP10 no concuerdan con los reportes de la literatura ya que en éstos se mencionan que en biopsias de hígado de los pacientes que no responden al tratamiento presentan un aumento en la expresión del ARNm y en los niveles séricos de la proteína antes del tratamiento [47, 49, 56]. Por un lado algunos reportes indican que después del tratamiento la expresión del ARNm de IP10 se incrementa tanto en pacientes RVS como en NR y por otro lado se reporta una disminución en la expresión del ARNm y de la proteína en pacientes RVS, mientras que en los pacientes NR ambos niveles permanecieron iguales después del tratamiento [57][32, 37]. También la proteína IP10 se detectó en hepatocitos de pacientes infectados con VHC aunque en este estudio no se relacionó con la respuesta al tratamiento, sí se observó una mayor expresión en hepatocitos donde el daño histológico fue mayor y se relacionó con un mal pronóstico así como en la progresión de la enfermedad [24]. Complementariamente, un reporte reciente señala que existe una forma truncada de IP10 que pudiera estar presente en pacientes NR [53]. Por lo tanto, sería importante evaluar nuevamente nuestros datos con los resultados de la respuesta viral sostenida (RVS), determinar la expresión de la proteína en el suero de los pacientes y realizar las pruebas inmunohistoquímicas en las biopsias hepáticas.

Los resultados de la expresión de ISG15 y OAS2 indican que estos genes son buenos marcadores en sangre periférica para monitorear a los pacientes que montan una respuesta viral temprana al tratamiento (EVR1) ya que existen diferencias entre controles y EVR después del tratamiento (EVR2). Al comparar las muestras EVR1 y EVR2 se encontró que la expresión de ISG15 fue mayor en pacientes EVR2, es decir que hubo una inducción en la expresión de ISG15. Al igual que para IP10, en ISG15 no se observó una sobreexpresión en los pacientes PNR1 como se reportó en biopsias de hígado [30, 36, 38]. Sin embargo, la inducción de estos genes después del tratamiento fue menor en los pacientes PNR. Los resultados de OAS2 fueron muy similares a ISG15.

Para todos los genes evaluados, la literatura reporta que la expresión del ARNm es mayor en muestras de pacientes que no responden al tratamiento desde antes de su administración, cuando se comparan con los controles sanos o pacientes que responden al tratamiento [31, 35-38]. Al respecto, Lanford *et al.* [34] menciona que la expresión de estos genes se puede detectar tanto en PBMCs como en hígado, Sarasin-Filipowicz *et al.* [32] reportó que aunque el INF administrado inducía mayor número de ISGs en PBMCs que en biopsias hepáticas, en éstas últimas se observaba mayor expresión de ISGs en NR antes del tratamiento en comparación a pacientes que respondían a él y esta expresión diferencial entre respondedores y no respondedores no era evidente en PBMCs.

En el presente estudio se logró ver esta tendencia en el caso del gen SOCS3, ya que en ningún ISG (IP10, ISG15 y OAS2) se observó una sobreexpresión relativa en las muestras pretratamiento de PNR en comparación a EVR.

En este estudio, los ISGs en las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes PNR se inducen menos en comparación a los niveles obtenidos en los EVR, por lo que es posible que la expresión de los ISGs pueda ser un reflejo de la infección existente por VHC que se lleva a cabo en el huésped y por lo tanto sugiere una inadecuada inducción de estos genes en las células de sangre periférica de los pacientes sin respuesta primaria (PNR). Por otra parte es posible que las células de sangre periférica tengan efectos distintos a los efectos locales que produce el virus en hígado [34]. Por otro lado, se tienen reportes de biopsias de hígado que detectan ISG15 por inmunohistoquímica dónde demuestran la expresión de esta proteína en hepatocitos de los no respondedores y en los macrófagos (células de Kupffer) de pacientes con respuesta virológica sostenida (RVS) lo cual sugiere que los macrófagos de los no respondedores presentan alguna incapacidad de expresión de este gen, por lo que se puede tomar en cuenta las diferencias en el nivel de expresión entre respondedores y no respondedores dependiendo del tipo celular, ya que estos genes se expresen tanto en hígado [38] como en sangre periférica.

En cuanto a la expresión de ISGs después del tratamiento, Taylor *et al.* demostraron que un grupo de pacientes con una expresión mayor de ISG15, OAS2 e IP10 en PBMCs un día después del tratamiento, también presentaban una menor carga viral y en consecuencia se comportaban como futuros respondedores. Por otro lado, Sarasin-Filipowicz *et al.* demostró que los pacientes que respondían al tratamiento a la cuarta semana en base a la carga viral, inducían la expresión de ISGs 4 horas después del tratamiento y ésta sobreexpresión era más marcada en biopsias hepáticas que en PBMCs. En este trabajo se observó una inducción en la expresión de todos los ISGs evaluados (IP10, ISG15 y OAS2) después del tratamiento cuando se compararon con las muestras pretratamiento tanto en EVR como en PNR, lo anterior concuerda con lo reportado por Sarasin-Filipowicz *et al* y Taylor *et al* [31, 32].

Al analizar la expresión de cada gen, hallamos tendencias que podrían diferenciar a pacientes EVR y PNR antes del tratamiento, con excepción de IP10. Sin embargo, en ningún caso se observó una expresión diferencial significativa que lograra distinguir a estos dos tipos de pacientes. Por lo anterior, se decidió evaluar la relación entre la expresión de estos genes por pares mediante correlación lineal, con la finalidad de obtener resultados más claros que permitan diferenciar entre los pacientes infectados con VHC que responden de los que no al tratamiento con pegINF+rib.

En la correlación lineal entre la expresión relativa del ARNm de OAS2 e ISG15 se observó una correlación positiva fuerte en los pacientes EVR antes del tratamiento que se mantiene después del tratamiento, además se presentan diferencias en comparación a los pacientes PNR donde no existe correlación entre la expresión de estos genes. Resultados similares se obtuvieron en las correlaciones entre la expresión del ARNm de SOCS3 y OAS2 en los pacientes EVR. Así, la combinación de ambos genes graficados en correlación lineal permitirá diferenciar entre estos dos tipos de pacientes y esperar una buena respuesta al tratamiento.

Los resultados más interesantes se obtuvieron al evaluar la correlación entre la expresión de SOCS3 e ISG15 en donde se observó una correlación positiva en los pacientes EVR antes y después del tratamiento y una correlación negativa en los pacientes PNR antes del tratamiento, debido a que la evaluación de ambos genes distingue a EVR de PNR podría ser un predictor de respuesta al tratamiento. En estos mismos pacientes se realizaron índices de expresión entre la expresión de SOCS3 con respecto al valor relativo de la expresión de los distintos ISGs al considerar que los resultados en la expresión de SOCS3 presentan una mayor tendencia en los pacientes PNR y una correlación lineal negativa entre SOCS3 e ISG15 de PNR significativa. Los resultados mostraron un valor numérico mayor en los pacientes PNR1 por tanto mientras los valores de esta relación se alejen más de la unidad los pacientes podrían tener potencialmente una menor respuesta al tratamiento. Es importante destacar que para tener resultados con significancia estadística sería necesario incrementar el tamaño de la muestra y considerar los resultados de respuesta viral sostenida (RVS) para poder descartar los pacientes con recaída. Varios artículos reportan que SOCS3 podría ser el causante de la falta de respuesta al tratamiento debido a que la proteína central del VHC induce la expresión de la proteína SOCS3 inhibidora de la vía de señalización INF, entre otras vías. Además, Vlotides *et al.* demostró que la sobreexpresión de SOCS3 inhibía la expresión de 2'-5'OAS tanto a nivel de ARNm como de la proteína [58, 59]. Nuestros resultados sugieren que a pesar de que en pacientes EVR se expresan ISGs antes del tratamiento, SOCS3 se sobreexpresa en los pacientes PNR, y esta podría una de las razones de la falta de respuesta al tratamiento.

En resumen nuestros resultados muestran diferencias en la expresión de SOCS3 en los pacientes sin respuesta primaria al tratamiento antes y después de este, así como diferencias importantes en la correlación de expresión de SOCS3 e ISG15. Finalmente los resultados sugieren que la relación numérica entre SOCS3 y la expresión de los ISGs evaluados en este trabajo muestra diferencias importantes en los pacientes con respuesta virológica primaria y sin respuesta primaria antes del tratamiento y por lo tanto podría ser un valor indicativo del potencial de respuesta.

CONCLUSIONES

La expresión de los ISGs evaluados (ISG15, OAS2 e IP10) y analizados individualmente no brindan información suficiente para distinguir entre los pacientes con respuesta viral temprana (EVR) al tratamiento de aquellos sin respuesta primaria (PNR). Sin embargo, en ISG15 y OAS2 se observó menor expresión de ARN mensajero en pacientes PNR antes del tratamiento comparado con EVR, por otro lado el gen SOCS3 presentó una tendencia que muestra mayor expresión en pacientes PNR antes del tratamiento.

Al realizar la correlación lineal entre pares de genes se obtuvo un hallazgo más interesante, una correlación positiva en la expresión de SOCS3 e ISG15 en EVR y una correlación negativa en PNR. A partir de lo cual se propuso realizar un índice de la expresión de SOCS3 en relación a cada ISG y se observó que los pacientes PNR presentan mayor expresión de SOCS3 en relación a cada ISG, a pesar de no tener diferencias estadísticas significativas.

De esta manera, el análisis de los genes individuales no brinda información suficiente que diferencie entre EVR y PNR. Sin embargo, el índice numérico de SOCS3/ISG podría ser un buen candidato que en un futuro nos ayude a predecir que pacientes responderán al tratamiento.

REFERENCIAS

1. Franciscus A., H.L. (2009) *A Guide to Understanding Hepatitis C. Hepatitis C Support Project*
2. Valencia, G.y., ed. *Hepatitis. Temas de Pediatría. 2000, McGraw-Hill Interamericana: México.*
3. Corey, K.E., et al., *Outcomes and treatment of acute hepatitis C virus infection in a United States population. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. 4(10): p. 1278-82.*
4. Maheshwari, A., S. Ray, and P.J. Thuluvath, *Acute hepatitis C. Lancet, 2008. 372(9635): p. 321-32.*
5. Micallef, J.M., J.M. Kaldor, and G.J. Dore, *Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. J Viral Hepat, 2006. 13(1): p. 34-41.*
6. Wang, C.C., et al., *Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance. J Infect Dis, 2007. 196(10): p. 1474-82.*
7. Yeung, L.T., et al., *Spontaneous clearance of childhood hepatitis C virus infection. J Viral Hepat, 2007. 14(11): p. 797-805.*
8. Strasak, A.M., et al., *Antibody dynamics and spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil. BMC Infect Dis, 2011. 11: p. 15.*
9. *Informe de la Secretaria: Hepatitis Viral. 62ª. Asamblea Mundial de la Salud 2009; Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A62/A62_22-sp.pdf.*
10. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science, 1989. 244(4902): p. 359-62.*
11. Chevaliez, P., *HCV Genome and Life Cycle, in Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology, S.-L. Tan, Editor. 2006, Horizon Bioscience: UK.*
12. Barth, H., T.J. Liang, and T.F. Baumert, *Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. Hepatology, 2006. 44(3): p. 527-35.*
13. Rehmann, B., *Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. J Clin Invest, 2009. 119(7): p. 1745-54.*
14. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol, 2004. 5(12): p. 1219-26.*
15. Villadangos, J.A. and P. Schnorrer, *Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. Nat Rev Immunol, 2007. 7(7): p. 543-55.*
16. Murphy K., T.P., Walport M., *Janeway's Immunobiology. 7th. ed. 2008: Garland Science Publishing.*
17. Liu, Y.C., J. Penninger, and M. Karin, *Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. Nat Rev Immunol, 2005. 5(12): p. 941-52.*
18. Harty, R.N., P.M. Pitha, and A. Okumura, *Antiviral activity of innate immune protein ISG15. J Innate Immun, 2009. 1(5): p. 397-404.*
19. Kim K., Z.D., *ISG15, not just another ubiquitin-like protein. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. 307: p. 431-434.*

20. Zhao, C., et al., Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(29): p. 10200-5.
21. Malakhov, M.P., et al., High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 16608-13.
22. Durfee, L.A., et al., The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Mol Cell*, 2010. **38**(5): p. 722-32.
23. Sampaio M, Andrade C., Lucio T. y Otávio da Costa Rocha, Soluble Inflammatory Markers as Predictors of Hepatocellular Damage and Therapeutic Response in Chronic Hepatitis C. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2009. **13**(5): p. 375-382.
24. Harvey, C.E., et al., Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(3): p. 360-9.
25. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo, SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(6): p. 454-65.
26. Raison, C.L., et al., Neuropsychiatric adverse effects of interferon-alpha: recognition and management. *CNS Drugs*, 2005. **19**(2): p. 105-23.
27. Dieperink, E., M. Willenbring, and S.B. Ho, Neuropsychiatric symptoms associated with hepatitis C and interferon alpha: A review. *Am J Psychiatry*, 2000. **157**(6): p. 867-76.
28. Sung, H., M. Chang, and S. Saab, Management of Hepatitis C Antiviral Therapy Adverse Effects. *Curr Hepat Rep*, 2011. **10**(1): p. 33-40.
29. Sarasin-Filipowicz, Interferon therapy of hepatitis C: Molecular insights into success and failure. *SWISS MED WKLY*, 2010. **140**(1-2): p. 3-11.
30. Chen, L., et al., Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*, 2005. **128**(5): p. 1437-44.
31. Feld, J.J., et al., Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology*, 2007. **46**(5): p. 1548-63.
32. Sarasin-Filipowicz, M., Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *PNAS*, 2008. **105**(19): p. 7034-7039.
33. Asahina, Y., et al., Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology*, 2008. **134**(5): p. 1396-405.
34. Lanford, R.E., et al., Genomic response to interferon-alpha in chimpanzees: implications of rapid downregulation for hepatitis C kinetics. *Hepatology*, 2006. **43**(5): p. 961-72.
35. Kanto, T., et al., Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol*, 1999. **162**(9): p. 5584-91.

36. Asselah, T., et al., *Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C*. *Gut*, 2008. **57**(4): p. 516-24.
37. Younossi, Z.M., et al., *Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin*. *Hepatology*, 2009. **49**(3): p. 763-74.
38. Chen, L., et al., *Cell-type specific gene expression signature in liver underlies response to interferon therapy in chronic hepatitis C infection*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(3): p. 1123-33 e1-3.
39. Huang, Y., et al., *Defective hepatic response to interferon and activation of suppressor of cytokine signaling 3 in chronic hepatitis C*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(2): p. 733-44.
40. Kim A. Y., e.a., *Hepatic SOCS3 expression is strongly associated with non-response to therapy and race in HCV and HCV/HIV infection*. *Journal of Hepatology*, 2009. **50**: p. 705-711.
41. Persico, M., et al., *Elevated expression and polymorphisms of SOCS3 influence patient response to antiviral therapy in chronic hepatitis C*. *Gut*, 2008. **57**(4): p. 507-15.
42. Chen L., S.J., Meng L., Heathcote J, Edwards A.,McGilvray I., *ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production in vitro: implications for chronic infection and response to treatment*. *Journal of General Virology* 2010. **91**(382-388).
43. Pawlotsky JM, H.A., Roudot-Thoraval F, Robert N, Bouvier M, Babany G, Duval J, Dhumeaux D., *Effect of alpha interferon (IFN-alpha) on 2'-5' oligoadenylate synthetase activity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis C: relationship to the antiviral effect of IFN-alpha*. *Antimicrob Agents Chemother.* , 1996. **40**(2): p. 320-4.
44. Kim, K.I., et al., *2'-5'-Oligoadenylate synthetase response ratio predicting virological response to PEG-interferon-alpha2b plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C*. *J Clin Pharm Ther*, 2006. **31**(5): p. 441-6.
45. Pawlotsky, J.M., et al., *Activity of the interferon-induced 2',5'-oligoadenylate synthetase in patients with chronic hepatitis C*. *J Interferon Cytokine Res*, 1995. **15**(10): p. 857-62.
46. Solinas, A., et al., *Changes of serum 2',5'-oligoadenylate synthetase activity during interferon treatment of chronic hepatitis C*. *Liver*, 1993. **13**(5): p. 253-8.
47. Apolinario A., D.M., Loiacono O., Lorente R., Perez C., Majano P.L, Clemente G., García-Monzón, *Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy*. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; **19**: 551–562., 2004. **19**: p. 551-562.
48. Narumi S, T.Y., Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T., *Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis*. *J Immunol.* , 1997. **158** (11): p. 5536-44.
49. Butera, D., et al., *Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C*. *Blood*, 2005. **106**(4): p. 1175-82.

50. Roe B., C.S., Hassan J., Grogan A, Farrell G, Norris S, Bergin C y Hall W., Elevated Serum Levels of Interferon-g-Inducible Protein-10 in Patients Coinfected with Hepatitis C Virus and HIV. *The Journal of Infectious Diseases* 2007. **196**: p. 1053-7.
51. Lagging M, R.A., Westin J, Norkrans G, Dhillon AP, Pawlotsky JM, Zeuzem S, von Wagner M, Negro F, Schalm SW, Haagmans BL, Ferrari C, Missale G, Neumann AU, Verheij-Hart E, Hellstrand K., IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology*, 2006. **44**(6): p. 1617-25.
52. Itoh, Y., et al., Clinical significance of elevated serum interferon- inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels. *J Viral Hepat*, 2001. **8**(5): p. 341-8.
53. Casrouge, A., et al., Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest*, 2011. **121**(1): p. 308-17.
54. Dimitriou, I.D., et al., Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol Rev*, 2008. **224**: p. 265-83.
55. Zeng, B., et al., Tumor-induced suppressor of cytokine signaling 3 inhibits toll-like receptor 3 signaling in dendritic cells via binding to tyrosine kinase 2. *Cancer Res*, 2008. **68**(13): p. 5397-404.
56. Diago, M., et al., Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut*, 2006. **55**(3): p. 374-9.
57. Romero, A.I., et al., Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*, 2006. **194**(7): p. 895-903.
58. Vlotides, G., et al., SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-alpha-induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **320**(3): p. 1007-14.
59. Bode, J.G., et al., IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J*, 2003. **17**(3): p. 488-90.

ANEXO I. (a) Secuencias iniciadoras utilizadas en los ensayos de PCR para los diferentes genes.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse	Pares de base amplificadas (pb)
GAPDH	5'-ACC ATC TTC CAG GAG CGA GAT-3'	5'-AGT CTT CTG GGT GGC AGT GAT -3'	339
SOCS3	5'-TCA CCC ACA GCA AGT TTC CCG C-3'	5'-GTT GAC GGT CTT CCG ACA GAG ATG C-3'	590
ISG15	5'-ATG GGC TGG GAC CTG ACG GTG AAG-3'	5'-GTT GAC GGT CTT CCG ACA GAG ATG C-3'	280
OAS2	5'-TCA GAA GAG AAG CCA ACG TGA-3'	5'-CGG AGA CAG CGA GGG TAA AT-3'	400
IP10	5'-ACT GCC ATT CTG ATT TGC T-3'	5'-AGA CCT TTC CTT GCT AAC TG-3'	231

ANEXO I. (b) Condiciones de amplificación para cada uno de los genes.

Gen	Buffer	[MgCl ₂] mM	Temperatura de hibridación (°C)	Tiempo de Hibridación (seg)	Número de ciclos
GAPDH	Sulfato de amonio (Fermentas)	1.5	59	25	28
SOCS3	Cloruro de potasio (Invitrogen)	1.25	63	25	35
ISG15	Cloruro de potasio (Invitrogen)	1.0	54	30	28
OAS2	Cloruro de potasio (Invitrogen)	1.25	51	30	26
IP10	Sulfato de amonio (Fermentas)	1.5	62	30	32