

T
1192

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124233

~ 4233



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PERFIL DE CITOCINAS DURANTE LA TERAPIA CON COLCHICINA, INTERFERON-alfa O PENTOXIFILINA EN PACIENTES CON HEPATITIS C CRÓNICA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M en Biol. Exp. ESPERANZA GABRIELA GUTIÉRREZ REYES

DIRECTOR:

DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ

ASESORES:

DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO, D.F.

NOV. 2007

El doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

La alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes, recibió beca del CONACyT de enero de 1999 a diciembre de 2002.
Registro 83927/133971

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que presentó:

Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes

El día 27 de Noviembre del año 2007

Sinodales:

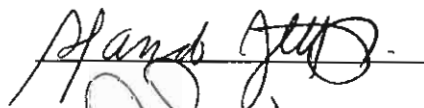
Dr. David Kershenobich Stalnikowitz



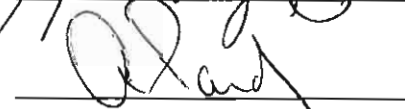
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz



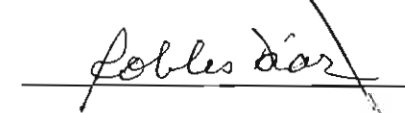
Dr. Alejandro Zentella Dehesa



Dra. Annie Pardo Semo



Dr. Guillermo Benito Robles Díaz



COMITÉ TUTORAL:

Director de Tesis

Dr. David Kershenobich Stalnikowitz

Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM).
Dpto. de Medicina Experimental Facultad de Medicina, UNAM
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel III

Asesores

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Responsable del Laboratorio de Fisiología Celular y Coordinadora de
Postgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Encargado del Dpto. de Bioquímica y Coordinador Académico del Instituto
Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran"
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

La presente investigación se realizó en el:

Laboratorio de Gastroenterología del
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
"Salvador Zubirán"

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco infinitamente a la Universidad Autónoma Metropolitana y al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición la oportunidad que me brindaron para crecer en conocimiento sobre las enfermedades hepáticas en especial la Hepatitis C crónica, mismos que me permitieron obtener el grado de doctora.

Así mismo al Dr. David Kershenobich Stalnikowitz por su enseñanza y confianza, a la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa como asesores y a los Drs. Annie Pardo Semo y Guillermo Benito Robles Díaz como sinodales, por su apoyo en la revisión, orientación y consejos en la presente tesis.

Con mucho amor y respeto a mis padres que donde se encuentren siempre serán un luz en mi camino.

A mi familia por todo el cariño y apoyo incondicional que me han dado durante la vida: José Luís, Tía Pola, Tía Sara, Marina, Lucila, Armando, Miguel, Rosario y todos mis sobrinos.

A mis amigos que siempre han estado ahí para escucharme y orientarme: Lety Zapien, Lety Sánchez, José Luís Urbina, Tere Ramírez, Soco Cruz, Jesús y Mineko.

A los todos los integrantes del Laboratorio HIPAM, los buenos momentos que hemos convivido y a Omar Agni García por su apoyo técnico.

ABREVIATURAS

°C = Grado Centígrado

μl = Microlitro

μg = Microgramo

μM = Micromolar

1-8U = Gen Estimulado por IFN, Gen de Actividad Antiviral

2-5 OAS = 2-5 Oligo Adenilato Sintetasa

ADAR-1 = Deaminasa Adenosin Específica de ARN

ADN = Acido Desoxiribonucleico

ALT = Alanino Transferasa

AMPc = Adenosin Mono Fosfato Cíclico

ARN = Acido Ribonucleico

ARNm = Acido Ribonucleico Mensajero

ALT = Alanino Aminotransferasa

AST = Aspartato Aminotransferasa

cADN = Acido Desoxirribonucleico Complementario

CARD = Dominio de reclutamiento y activación de caspasa

CD = Células Dendríticas

CEH = Células Estelares Hepáticas

CES = Células Endoteliales Sinusoidales

CK = Células de Kupffer

CMN = Células Mononucleares

COL = Colchicina

CREB = Proteína de Unión al Elemento de Respuesta al cAMP

CTL = Células T Citotóxicas

CV = Carga Viral

CxCL = Quimiocinas

DEPC = Dietilpirocarbonato

dsRNA = ARN de Doble Cadena

dNTPs = deoxi Nucleótidos trifosfato

EcoRI = Endonucleasa de Restricción

EDTA = Acido Etilendiaminotetraacético

eIF-2α = Subunidad alfa de Factor 2 de Iniciación de la Traducción Eucariótica

ELISA = Ensayo Inmunoenzimático

FasL = Fas Ligando

fg = Fentogramo

GBV = Virus GB

grp78 = Proteina Reguladora de la Glucosa

h = Hora

HCC = Hepatitis C Crónica

Hind III = Endonucleasa de Restricción

HLA = Antígeno de Histocompatibilidad

HVR = Región Hipervariable

IFN = Interferón
IKK-e = Cinasa del Inhibidor del NFκB-e
IL = Interleucina
IFN α = Interferón Alfa
IRES = Región Interna de Entrada al Ribosoma
IRF 3 = Factor Regulador de IFN 3
ISDR = Región determinante de la sensibilidad al IFNα
ISGs = Genes Estimulados por IFN
ISGF-3= Factor génico 3 estimulado por IFN
ISRE = Elemento de respuesta estimulado por IFN

Jak/STAT= Cinasa Janus/Transductor de Señales y Activador de la Transcripción

kDA= Kilodaltón
Kb = Kilobase

LIH = Linfocito Intrahepático

M = Molar
MEC = Matriz Extracelular
MHC = Complejo Mayor de Histocompatibilidad
m= meses
min = Minuto
ml = Mililitro
mM = Milimolar
MxA = Trifosfatasa de Guanosina

NaCl = Cloruro de Sodio
NFκB = Factor Nuclear kappa B
ng = Nanogramo
NK = Célula Asesina Natural
nm = Nanómetro
NS = Proteínas No Estructurales del VHC
NTR = Regiones No Traducidas
NTPs= Nucleotidos trifosfato

ORF = Marco de Lectura Abierto

p56 = Proteína 56
PAMP = Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
pb = Pares de Bases
PBS = Amortiguador de Fosfatos
PDGF = Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
peg = Pegilado
PF2A = Proteína Fosfatasa 2ª
pg = Picogramo
PKR = Proteína Cinasa R
PRR = Patrones de Receptores de Reconocimiento

PTX = Pentoxifilina

RIG I = Gene Inducible por Acido Retinoico I

RNAse L = Acido Ribonucleótidas

rpm = Revoluciones por Minuto

RPMI-1640 = Medio de Cultivo

RT-PCR = Retro Transcripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa

SOCS = Supresor de la señalización de citocinas

STAT1 = Transductor de Señales y Activador de la Transcripción 1

TBE = Tris-Borato-EDTA

TBK1 = Cinasa relacionada con IKK

TGF β = Factor de Crecimiento Transformante Beta

Th = Células T Cooperadoras

TLR = Receptores Semejantes a Toll

TNF = Factor de Necrosis Tumoral

U = Unidad

UV = UltraVioleta

VHC = Virus de Hepatitis C

VIH = Virus de la Inmunodeficiencia Humana

INDICE

RESUMEN Y ABSTRACT	3
Resumen	3
Abstract	5
INTRODUCCIÓN:	
1. Estructura y función del hígado	7
2. Hepatitis C	11
3. Clasificación del virus de la hepatitis C (VHC)	13
4. Morfología del VHC	17
5. Estructura del genoma del VHC	18
6. Estructura proteica y funciones del VHC	20
7. Replicación viral	22
a. Internalización	23
b. Replicación	23
8. Funciones accesorias de las proteínas virales	24
9. Patrones del ARN viral durante la infección	28
10. Bases Moleculares de la persistencia del ARN del VHC.	29
11. Inmunopatogénesis de la Hepatitis C	31
12. Propiedades inmunomoduladoras de las citocinas	39
13. Estrategias de evasión viral	43
a. Evasión de la respuesta inmune innata	43
b. Evasión de la respuesta inmune adaptativa	45
14. Terapia antiviral:	
a. Colchicina (COL)	48
b. Interferón-alfa 2b (IFN-a)	50
c. Pentoxifilina (PTX)	52
JUSTIFICACIÓN	53
OBJETIVOS	54
HIPÓTESIS NULA	55
MATERIAL Y MÉTODOS	56
1. Selección de Pacientes	56

2. Biopsia Hepática, Histología y Extracción de ARN total	57
3. Obtención de Células Mononucleares (CMNs)	58
4. Extracción de ARN total de CMNs	59
5. Cuantificación de Ácidos Nucleicos	60
6. Expresión de Citocinas en CMNs y biopsia hepática	61
a. Control interno	61
b. Construcción de sonda	61
c. Transcripción Reversa	63
d. Reacción en cadena de la polimerasa	64
7. Secreción de Citocinas por CMNs	64
8. Análisis Estadístico	64
RESULTADOS	
1. Citocinas en CMNs y tejido hepático	66
a. Colchicina	66
b. Interferón-alfa	70
c. Pentoxifilina	73
2. Aminotransferasas	78
3. Carga Viral	80
4. Histopatología	81
RESUMEN DE RESULTADOS	82
DISCUSIÓN	86
CONCLUSIÓN	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	131

RESUMEN

La hepatitis C crónica (HCC) es una enfermedad ocasionada por el virus de la hepatitis C (VHC), es un virus ARN que pertenece a la familia de los flavivirus. A nivel mundial es una enfermedad que afecta aproximadamente a 170 millones de personas, se considera el 3% de la población mundial, en México es alrededor del 1.2-1.8% de personas que padecen estas enfermedad. La hepatitis C crónica es una enfermedad que evoluciona a cirrosis hepática después de 20 años de haber adquirido la infección y por último a hepatocarcinoma celular, hasta el momento no existe tratamiento adecuado (cura) para esta enfermedad.

Se conoce que el VHC dispara mecanismos intracelulares que producen inflamación y necrosis en el hígado, y además activan la respuesta inmune del huésped. Las moléculas que participan activamente en este proceso son las citocinas, ocasionando una cascada de activación de varias citocinas durante la infección por el VHC.

Nos planteamos conocer que efecto tiene el IFN- α y otros fármacos como son la Pentoxifilina (PTX) y la Colchicina (COL) sobre la expresión y secreción en células mononucleares (CMNs) de IL-1 β , el TNF- α , el IFN- γ y CXCL-8/IL8, además de su expresión en el tejido hepático, se conoce que participan en la respuesta del huésped contra el VHC. Cada uno de los medicamentos que decidimos estudiar tienen funciones diferentes, el IFN- α 2b actúa como inmunomodulador y antiviral, antifibrogénicos (COL) o anti-inflamatorias (PTX).

Resultados: La IL-1 β , el TNF- α , el IFN- γ son citocinas pro inflamatorias y CXCL-8 es una quimiocina que atrae neutrofilos a los sitios de daño. Encontramos que cada uno de los fármacos modificó de manera diferencial la expresión y secreción de estas

proteínas. En CMNs de los pacientes con VHC, los 3 tratamientos después de un año disminuyeron mínimamente la expresión de estas citocinas. En cuanto a la secreción, la PTX fue el único fármaco que disminuyó las 4 moléculas que estudiamos al año de tratamiento mientras que el IFN- α y la COL no tuvieron efecto sobre CXCL-8. En la biopsia hepática, el IFN- α disminuyó la expresión del ARNm de TNF- α . En el grupo de COL la expresión de CXCL-8 se elevó de manera significativa al comparar con los valores basales, probablemente porque las proteínas virales inducen la producción de esta quimiocina. La PTX redujo el ARNm de IL-1 β y TNF- α durante todo el año, comprobando el efecto anti-inflamatorio en HCC que se le ha atribuido en otras enfermedades hepáticas. A los 2 meses se cuantificó la carga viral en los 3 grupos de pacientes y encontramos que el único fármaco que tuvo acción antiviral fue el IFN- α ya que redujo la carga viral, mientras que en el grupo que recibió COL la carga viral fue alta durante todo el tiempo de tratamiento, lo que refleja que el VHC continua replicándose en las células de los pacientes.

Conclusión: En la HCC existe un componente inflamatorio que contribuye a la cronicidad de esta infección. El IFN- α , la COL y la PTX modifican de manera diferencial a algunas citocinas pro-inflamatorias. La PTX fue el único medicamento que modificó a nivel periférico y en tejido el proceso inflamatorio que sucede en la HCC. Es necesario considerar la posibilidad de una terapia combinada que aumente la respuesta celular y complemente el efecto de los fármacos antivirales (IFN- α) para inhibir la replicación del virus.

ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) is a highly mutable, hepatotropic RNA virus that causes acute and chronic hepatitis. Chronic hepatitis C (CHC) is responsible for progressive liver disease leading to cirrhosis, end-stage liver disease, and hepatocellular carcinoma. The worldwide prevalence of CHC is about 170 million people (3%) and in México it is approximately of 1.2-18%. The mechanism of liver injury caused by HCV is thought to be mediated by the host's cellular immune response. An effective host response against virus requires a coordinated effort of both nonspecific and specific antigen immune responses, including the production of various cytokines and chemokines. The imbalance of pro-inflammatory cytokines such as Interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, Interferon gamma (IFN- γ), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α), CXCL8/IL-8 and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10) in liver tissue and in peripheral blood may contribute to viral persistence and chronic liver disease. Colchicine (COL) has been used as antifibrogenic therapy in others diseases, IFN-alpha 2b (IFN- α) is a molecule that has immuno-modulatory and antiviral activity and Pentoxifylline (PTX) ameliorates inflammatory response in CHC not only by inhibiting TNF- α but also suppressing others cytokines.

The aim of the study is to analyze the expression and secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1beta, TNF- α , IFN- γ and the chemokine CXCL8/IL-8 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and their expression in liver tissue of patients with CHC, before and after to IFN- α , COL or PTX therapy.

We studied twenty six patients with clinical and histological diagnosis of CHC. All were HCV-RNA (+), quantitative HCV-RNA ranged from 23,000 to 3,000 000 UI/ml; none

had a concomitant systemic diseases or autoimmunity. All were naïve to antiviral treatment. All patients were genotype 1 and had fibrosis score was F1-F4 according to Metavir classification. The ALT and AST, viral load, and Metavir score were measured before and after treatment. Eight patients received COL, 7 IFN- α and 11 PTX.

None of them had significant changes in the Metavir score following COL, IFN- α or PTX administration. IFN- α was the only to induce a significant decreased in viral load ($p < 0.05$). Aminotransferases were modified by PTX during treatment but histology was not modified.

We found that COL, IFN- α and PTX minimal diminished the expression of cytokines in PBMC; the effects on cytokine secretion were more evident and significantly varied among treatments. PTX was the only therapy that diminished the secretion of IL-1, TNF- α , IFN- γ and CXCL-8/IL-8 whereas IFN- α and COL did not modified the later. In liver biopsy specimens COL significantly increased the CXCL-8 expression, IFN- α down regulated the expression of TNF- α and PTX reduced RNAm of IL-1 β and TNF- α when compared with pretreatment values respectively.

CONCLUSION: The inflammatory process seen in chronic hepatitis C seems to contribute to chronicity. Treatment with COL, IFN- α or PTX differentially modified the expression of pro-inflammatory cytokines. Locally (within the liver) and systemically (PBMC) produced cytokines may serve as biomarkers of inflammation on CHC. PTX inhibits the expression of several pro-inflammatory cytokines in the liver and in PBMC. Combined therapies using either COL or PTX along with IFN- α looking to modify the host's inflammatory response and inhibit the viral replication seem promising and wroth to explore in large clinical trials.

INTRODUCCIÓN

1. Estructura y función del hígado

El hígado es la glándula más grande del cuerpo, pesa alrededor de 1400-1800 gramos. Es uno de los órganos vitales del cuerpo humano. Normalmente ocupa el hipocondrio derecho, el epigastrio y una porción del hipocondrio izquierdo. Tiene relación con la región lumbar de la pared posterior del tórax. El hígado está envuelto por una cápsula fibrosa de tejido conectivo (cápsula de Glisson). Consta de dos lóbulos principales, el derecho y el izquierdo (siendo mucho mayor el derecho), y un tercer lóbulo más pequeño llamado caudado. El hilio hepático es el sitio donde entran y salen los principales vasos y conductos biliares. El tejido hepático está compuesto de parénquima y estroma. El primero comprende células epiteliales de origen endodérmico llamadas hepatocitos, en tanto que el segundo es tejido conectivo de origen mesenquimatoso. El lóbulo hepático está formado por hepatocitos. En contraste a los hepatocitos que ocupan casi el 80% del total del volumen hepático y realizan la mayoría de las numerosas funciones del hígado, las células no parenquimatosas, contribuyen únicamente con el 6.5% del volumen hepático, el 40% del número total de células hepáticas, están localizadas en el compartimiento sinusoidal del tejido. Las paredes del sinusoides hepático son delineadas por 3 diferentes tipos celulares: células endoteliales sinusoidales (CES), células de Kupffer (CK) que representan macrófagos derivados de monocitos y células estelares hepáticas (CEH). Además existen linfocitos intrahepáticos (LIH) que incluye células pit, es decir, células asesinas naturales (NK) específicas del hígado que se encuentran en el lumen sinusoidal. A la fecha se reconoce que bajo condiciones

normales o patológicas, muchas funciones de los hepatocitos son reguladas por sustancias liberadas de las células vecinas no parenquimatosas (1,2). La bilis es la secreción exocrina de los hepatocitos, que es transportada al duodeno a través de los conductos biliares (**figura 1a**; 1,3).

El hígado recibe su irrigación por dos fuentes: la mayor parte de la sangre (85%) por la vena porta que drena casi toda la sangre del intestino. Esto asegura que el alimento absorbido vaya directamente al hígado donde puede ser metabolizado y dispuesto para su utilización, el otro 15% proviene de la sangre de las arterias hepáticas. La vena y la arteria hepática llegan a la víscera y penetran en el hilio hepático y de ahí salen a los conductos hepáticos derecho e izquierdo y los linfáticos (1).

Los productos exocrinos de los hepatocitos, son elaborados y descargados en los conductillos biliares, mientras que, la secreción interna elabora glucosa, proteínas y lipoproteínas, los cuales pasan al torrente sanguíneo (1,3).

La superficie de cada hepatocito colinda con un conductillo biliar y con un sinusoides sanguíneo. Los sinusoides y los hepatocitos se encuentran entre las circulaciones venosa portal y arteria hepática (1,3).

Entre la capa endotelial que cubre los sinusoides hepáticos y los hepatocitos que limitan se encuentra el espacio perisinusoidal de Disse. Las células endoteliales y las células de Kupffer, son incorporadas en el revestimiento sinusoidal al quedar intercaladas entre las células del endotelio y otras en el espacio de Disse. Las CK son móviles, evitando la posible obstrucción de los sinusoides, además intervienen de

manera importante para eliminar bacterias que están en la sangre porta que llega del intestino (Figura 1b; 1-5).

Dentro de sus funciones más importante, los hepatocitos se ocupan de diversas reacciones de transformación y conjugación de extraordinaria importancia para la destoxificación de algunos compuestos endógenos y exógenos nocivos para el organismo, también metabolizan esteroides y alcohol. Además secretan albúmina, fibrinógeno y casi todas las globulinas del plasma a los sinusoides y participan en la síntesis de lipoproteínas (1-4).

Las células mononucleares constituyen otra importante población celular y están involucradas con el sistema inmune. Su función básica es la fagocitosis. Todas las células del sistema mononuclear se originan en la médula ósea, después de su maduración y posterior activación, pueden adquirir diferente morfología. Una vez que colonizan los tejidos, estas células maduran y se convierten en macrófagos. Se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos, y realizan funciones en la defensa del huésped aún antes que se establezca la inmunidad específica, a través de células dendríticas (CD) y células pit (1,2).

El tejido hepático posee una notable capacidad de regeneración y por lo tanto puede soportar el estrés fisiológico. La falla hepática ocasiona menos producción de protrombina y fibrinógeno. La disminución de la secreción de bilis también ocasiona la disminución en la absorción de vitaminas liposolubles (1,3).

A menudo la disfunción hepática es causada por infecciones virales y/o agentes tóxicos como tetracloruro de carbono (experimentalmente), alcohol, acetaminofen (en

dosis excesivas) y otros. Independientemente del factor etiológico esta disfunción se manifiesta como hepatitis y/o cirrosis.

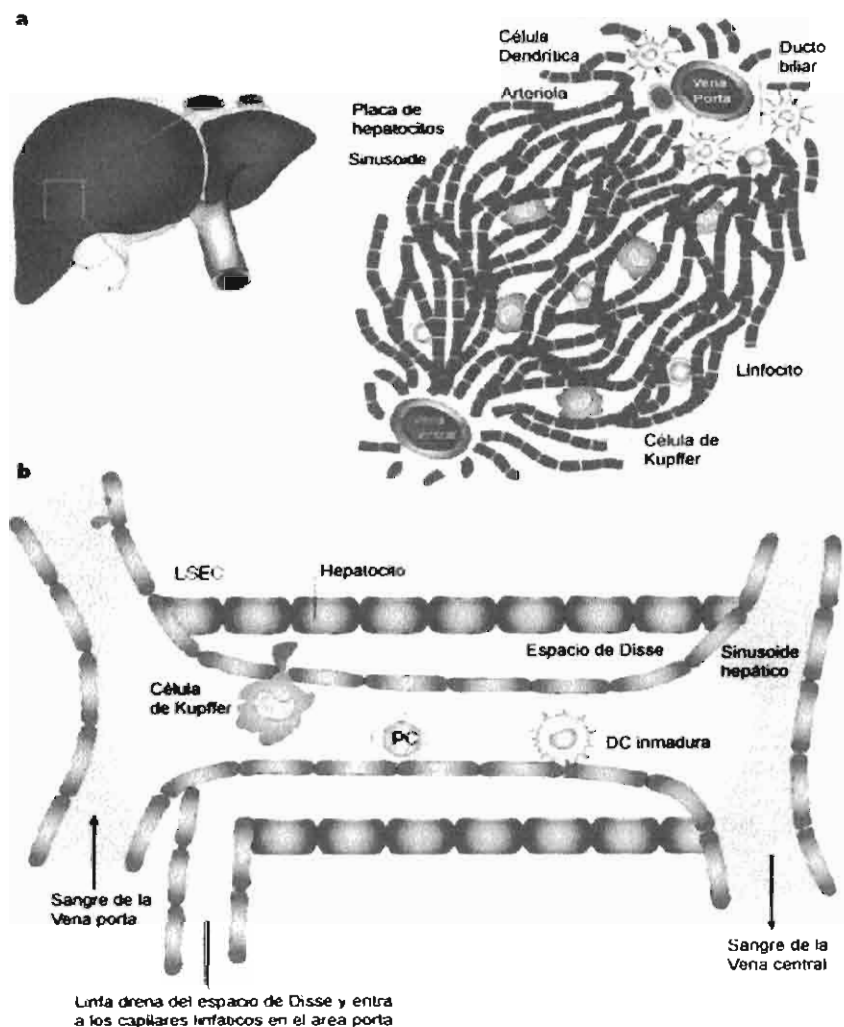


Figura 1. Micro ambiente hepático. A. Diagrama que muestra la estructura del lóbulo hepático organizado alrededor de haces vasculares, los cuales son conocidos como tractos portales. Este contiene una ramificación de la vena porta, una de la arteriola y un ducto biliar. De los tractos portales, la sangre fluye a través de una malla de sinusoides anastomosada semejante a una esponja que existe entre las placas de hepatocitos. Los sinusoides contienen una gran población de macrófagos, conocidos como células Kupffer (CK). **B.** Organización de los sinusoides. El sinusoides es delineado por endotelio (células endoteliales sinusoidales hepáticas CES) que están fenestradas y les falta una membrana de basamento. Las CK, linfocitos (células Pit, PCs) y células dendríticas inmaduras (DCs) se encuentran en el sinusoides. Las CK existen principalmente en el lumen sinusoidal, que pueden tener contacto directo con hepatocitos. El espacio subendotelial, conocido como espacio de Disse, es la región de la cual se origina la linfa hepática. Tomado de Crispe IN (5)

2. Hepatitis C

La hepatitis C se ha convertido en un serio problema de salud a nivel mundial, se estima que 170 millones de personas están infectadas, alrededor del 3% de la población mundial (6-9). Sin embargo, la prevalencia del virus de la hepatitis C (VHC) causante de esta enfermedad varía enormemente entre los diferentes países. El VHC es un importante patógeno que causa enfermedad hepática crónica (6,10). En 1975, por primera vez se reconoció su existencia cuando se demostró la presencia de este virus en la mayoría de los casos de hepatitis asociados a transfusión sanguínea y la referían como hepatitis no A, no B. En 1989, Houghton y colaboradores clonaron y secuenciaron el genoma del VHC (11), lo que permitió el conocimiento de la biología molecular del VHC y así poder desarrollar pruebas diagnósticas (12-14) serológicas y virológicas que son esenciales para el manejo de los pacientes con hepatitis C crónica (HCC) (15).

El VHC es extraordinariamente hábil, produce una infección persistente que en algunos casos es interrumpida por la terapia basada en IFN- α , el virus puede permanecer activo durante toda la vida en el individuo y tiene varias oportunidades para posteriores transmisiones en la población humana (10, 16, 17). Esta habilidad es enlazada con una capacidad para evadir y antagonizar la respuesta inmune tanto humoral como celular del huésped, las cuales son incapaces de erradicar la infección en la mayoría de los pacientes (16-22), y sostener un bajo grado de inflamación (8, 9, 21). El VHC tiene una alta variabilidad genética, lo que le confiere la capacidad para escapar de la respuesta inmune del huésped, el virus no es directamente citopático (23) y las lesiones hepáticas están relacionadas a mecanismos mediados por la

inmunidad, los cuales son caracterizados por una predominante respuesta celular Th1 (24).

La hepatitis C aguda solo en el 25% de los pacientes infectados hay manifestaciones clínicas. La mayoría de los individuos infectados (>80%) desarrollan HCC. Se ha establecido que del 14%-46% de pacientes pueden eliminar la infección de forma espontánea, usualmente dentro de los primeros meses después de la infección. Factores virales y del huésped juegan un papel importante en la eliminación (y por tanto en la persistencia) de la infección (10, 17-19). La hepatitis C crónica es una enfermedad silenciosa que se asocia con elevaciones fluctuantes o persistentes de los niveles de alanino aminotransferasa (ALT) y en menor grado de aspartato aminotransferasa (AST) (25, 26). Un número significativo de individuos infectados permanecen ignorantes de la infección durante décadas, la infección conduce a un deterioro lento pero progresivo de la función hepática, ocasionando la formación de cicatriz, fibrosis hepática y cirrosis (en el 60% de los casos), y por último puede desarrollar carcinoma hepatocelular (20, 21, 26-29). El impacto clínico de la enfermedad asociada a hepatitis C se espera que incremente en las siguientes 2 ó 3 décadas como consecuencia de estas complicaciones (10, 22, 25, 30). Algunos factores pueden predecir la gravedad de la enfermedad; entre ellos ingestión concomitante de alcohol, adquisición de la enfermedad después de los 40 años, género masculino. Algunos factores genéticos e inmunológicos pueden tener un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. (24)

En general, mujeres y personas jóvenes tienen la capacidad de eliminar al virus más rápido después de la infección. Hasta el momento, el único factor viral asociado con

la eliminación o persistencia de la enfermedad, son la existencia de variantes virales llamadas quasiespecies. Farci y colaboradores estudiaron la diversidad de las quasiespecies en la región hipervariable 1 (HVR1) de la porción E2 del genoma del VHC en 3 grupos de pacientes (aquellos que resolvieron la infección, con infección persistente o con falla hepática fulminante) notando que hubo una mayor diversidad en el grupo con infección persistente (31). Estos hallazgos son consistentes con el efecto de la presión inmune en HVR1: mínima presión ocasiona persistencia viral, mayor presión puede resultar en la eliminación y la más fuerte en insuficiencia hepática grave capaz para causar falla hepática fulminante (32).

El tratamiento disponible para la hepatitis C es la terapia con IFN- α pegilado más Ribavirina (7, 25, 28, 33), el IFN- α es un potente agente antiviral y ambos funcionan como inmunomoduladores. Hasta el momento no hay una vacuna disponible para el VHC en humanos (34)

La transmisión del VHC esta ligada fundamentalmente con la contaminación sanguínea, la transmisión sexual y perinatal son mínimas. Se consideran grupos de alto riesgo los que están expuestos a: uso de drogas intravenosas, procedimientos médicos como hemodiálisis, trabajadores de la salud, receptores de transfusión sanguínea, recién nacidos de madres con hepatitis C y aquellos que se realizan tatuajes sin asepsia (35).

3. Clasificación del VHC

El VHC es un miembro del género *Hepacivirus* en la familia *Flaviviridae*. Los virus que pertenecen a esta familia tienen un ácido ribonucleico (ARN) de una sola cadena con

sentido positivo y una organización similar entre ellos (18, 21, 22, 36). Entre los *flavivirus*, se encuentran el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa y el del dengue, los cuales son causa importante de enfermedades virales transmitidas por artrópodos a los humanos. Los virus GB (GBV-A, GBV-B, GBV-C/HGV) que también han sido clasificados como miembros de los *flavivirus* están estrechamente relacionados con el VHC y pueden infectar a los humanos y a los chimpancés (GBV-C/HGV) y monos (GBV-A, GBV-B). El virus GB-B, puede causar hepatitis en algunas especies de monos infectados experimentalmente.

Una característica distintiva del VHC es su heterogeneidad genética, (diferencias en cuanto a secuencias de nucleótidos) (37), en base a ello se ha clasificado en 6 genotipos principales y 11 a 12 subtipos que difieren en aproximadamente el 35% de su secuencia de nucleótidos (36, 38, 39). Hay investigadores que señalan la existencia de 9 genotipos principales y de cerca de 100 subtipos. Los diferentes subtipos dentro de un mismo genotipo difieren de 14 al 25% en su secuencia nucleotídica. Aunque los diferentes genotipos pueden ser encontrados en todo el mundo, hay diferencias claras en su distribución geográficas (39, 40). Los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a están ampliamente distribuidos en el 90% de las infecciones por VHC en Norte y Sur América, Europa, Rusia, China, Japón y Australia/Nueva Zelanda. El genotipo 1a y 1b representan aproximadamente el 60% de la infección global. El genotipo 1b es el responsable de la mayoría de las infecciones en Europa Oriental, China, Japón y México (39) El genotipo 3a se encuentra con relativa frecuencia a través de Europa y América. Otros subtipos del genotipo 3 son prevalentes de Nepal, Bangla Desh, India y Pakistán. El genotipo 4a es el

responsable de la mayoría de las infecciones en Egipto y éste junto con otros subtipos del genotipo 4 constituye la mayoría de las infecciones en el África Central. El genotipo 5a es el responsable de la mayoría de las infecciones en Sudáfrica. Los genotipos 4 y 5 son rara vez encontrados fuera del África. El genotipo 6 se ha aislado principalmente en el sudeste de Asia. La distribución de los diferentes genotipos varía significativamente entre los distintos grupos de población en una misma área geográfica (**Figura 2**). Un ejemplo es la alta prevalencia del genotipo 3a entre la población joven que consume drogas en los países del Este de Europa.

El impacto de los genotipos del VHC a lo largo del desarrollo de la infección es aún controversial, sin embargo está bien establecido que los genotipos del VHC están asociados con la respuesta al tratamiento con interferón así como a la terapia combinada de interferón más ribavirina. Los pacientes infectados con genotipo 1, principalmente el subtipo b responden menos al tratamiento antiviral, comparados con pacientes infectados con genotipo 2 ó 3. Asimismo, los pacientes infectados con genotipo 4 presentan una baja respuesta al tratamiento. La genotipificación usualmente se lleva a cabo por la secuenciación de regiones seleccionadas del ARN viral (37, 38). La hepatitis C se presenta en 4% a 5% de todos los casos registrados de hepatitis en el país. En 2002 se notificaron alrededor de 1,100 casos anuales y una tasa de 1.21 casos por cada cien mil habitantes (35).

Los pacientes infectados crónicamente tienen cargas virales que típicamente son 10^2 - 10^7 genomas por ml de suero. Un modelo matemático de dinámica viral durante el tratamiento con IFN- α indica que los viriones de VHC se recambian rápidamente (con una vida media del alrededor de 3 horas) y con una alta replicación, estimada en 10^{12}

viriones producidos por día en una persona infectada (41,42). Esto es 100 veces más de lo reportado para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se han observado cargas virales altas durante la primera semana de infección por VHC, mientras que el proceso inflamatorio que conduce al daño hepático está retrasado, y ocurre generalmente después de 2-3 meses de la infección (25).

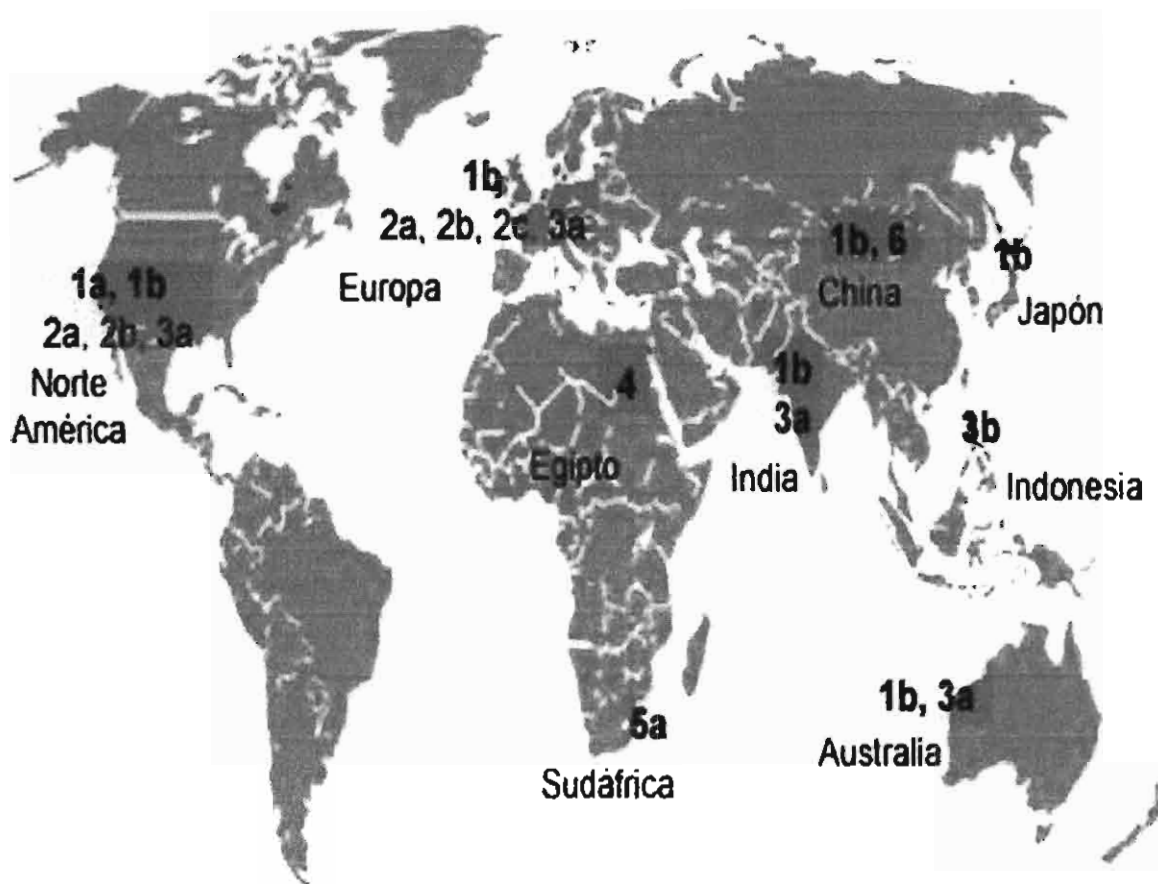


Figura 2. Distribución Mundial de los genotipos del VHC. La distribución de los diferentes genotipos varía entre la población en una misma área geográfica.

El VHC como muchos ARNs virales, manifiesta considerable heterogeneidad genética debido a la presencia de una ARN polimerasa de baja fidelidad a la que le falta corrección del marco de lectura y con actividad de exonucleasa 3'-5'. La combinación de una alta tasa de replicación y la falta de actividad de corrección de lectura de la ARN polimerasa dependiente de ARN favorecen la selección de variantes de virus que replican eficientemente, los cuales escapan al reconocimiento de la respuesta inmune celular y humoral. Esta variación conduce a la presencia de múltiples variantes virales estrechamente relacionadas, las cuales contienen especies predominantes que difieren por cambios menores en los nucleótidos (40), estas son designadas como quasiespecies dentro de un mismo paciente infectado. Estas son el resultado de mutaciones que se acumulan a lo largo de la infección, o bien mutaciones que se producen a partir de la infección debida a la transmisión simultánea de múltiples especies virales. Las quasiespecies tienen un mecanismo que modifica la respuesta inmunológica y la posibilidad de responder al tratamiento (40, 43). Aunque la heterogeneidad genética en las quasiespecies se encuentra a través de todo el genoma, ciertas regiones son hipervariables. La complejidad de las quasiespecies puede potencialmente influenciar el curso de la infección aguda, la gravedad del daño hepático, la persistencia de la infección y la respuesta a la terapia con interferón (43,44).

4. Morfología del VHC

El VHC es una partícula viral esférica con una cubierta lipídica de 30-80 nm de diámetro. La variación en tamaño de las partículas observadas refleja la dificultad de obtener preparaciones virales puras debido al bajo título de virus en los fluidos

corporales. Las partículas tienen una densidad muy baja (de 1.09 a 1.11 g/cm³ en gradiente de sacarosa) debido probablemente a su asociación con lípidos y lipoproteínas séricas como la lactoferrina y complejos inmunes. Las proteínas estructurales (core, E1 y E2) son los principales constituyentes de la partícula viral. La cubierta consiste de dos proteínas la E1 y la E2, las cuales probablemente forman espigas en la superficie del viron. Dentro de la cubierta se encuentra la nucleocápside que consiste de la proteína core y el ARN viral, la cual es parecida a un icosaedro en su estructura (**Figura 3a** 18, 20). Las proteínas estructurales se encuentran en el extremo amino, mientras que las proteínas no estructurales (NS2 a NS5) se encuentran en el extremo 3', estas últimas son importantes para la propagación viral (6, 21).

5. Estructura del genoma del VHC

El genoma del VHC consiste de un ARN de cadena positiva de aproximadamente 9600 nucleótidos. Contiene un solo marco de lectura abierto (ORF), flanqueado en cada extremo terminal por regiones no traducidas (NTR). La traducción del ORF produce una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. La poliproteína es procesada por proteasas celulares y virales en cuatro proteínas estructurales y seis proteínas no-estructurales (NS). En el extremo 5' del ARN se encuentra una NTR (5'-NTR) de 341 nucleótidos, la cual está altamente conservada tiene más del 90% de homología entre la secuencia de los diferentes VHC aislados, esta región es necesaria para la traducción de la poliproteína. Consiste de cuatro asas y una estructura de pseudonudo, las cuales constituyen el sitio interno de entrada al

ribosoma (IRES). La presencia del IRES permite al ARN del VHC ser traducido por un mecanismo de traducción independiente de 5'cap, distinto de la mayoría de los mecanismos de traducción de los ARNm celulares. El IRES del VHC incluye una pequeña parte de la región amino terminal del ORF (Figura 3b). Así, este mecanismo de traducción ofrece blancos potenciales para la generación de agentes antivirales (18, 36).

Debido a la conservación en la secuencia 5'-NTR, esta región es utilizada para diseñar los oligonucleótidos requeridos para la transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) útil en la detección del ARN del VHC. En el extremo terminal 3' del ARN hay una secuencia no traducida de aproximadamente 200 nucleótidos, además se encuentra una región de 98 nucleótidos denominada X. Esta región no se había detectado en la secuencia originalmente reportada. Estudios subsecuentes muestran que esta es la región más conservada de todo el ARN viral., forma una estructura de tres asas, la cual es conservada en todos los aislados del VHC. La región X puede estimular la traducción de las proteínas virales, posiblemente interaccionando con la maquinaria de traducción en el sitio 5'-NTR (36). El 3'-NTR es también importante para la replicación del ARN, ya que presumiblemente contiene secuencias reconocidas por la polimerasa viral para la replicación del ARN. Debido a su importancia funcional y a la secuencia conservada, la región 3'-NTR es también un blanco potencial para los agentes antivirales. Sin embargo, la región 3'-NTR no ha sido una región útil en la detección del ARN del VHC por RT-PCR, probablemente debido a la presencia de estructuras secundarias. Tanto la región 5' y 3'-NTR interaccionan con varias proteínas celulares,

las cuales pueden ser importantes para la traducción o replicación del ARN viral (10, 16-22). Datos recientes muestran que la proteína p7 aumenta la permeabilidad de la membrana para promover la entrada del virus (45). También se ha descrito otra proteína, la proteína F, su expresión se generada en el complejo ribosomal y hasta el momento se desconoce su función (46) (Figura 3b).

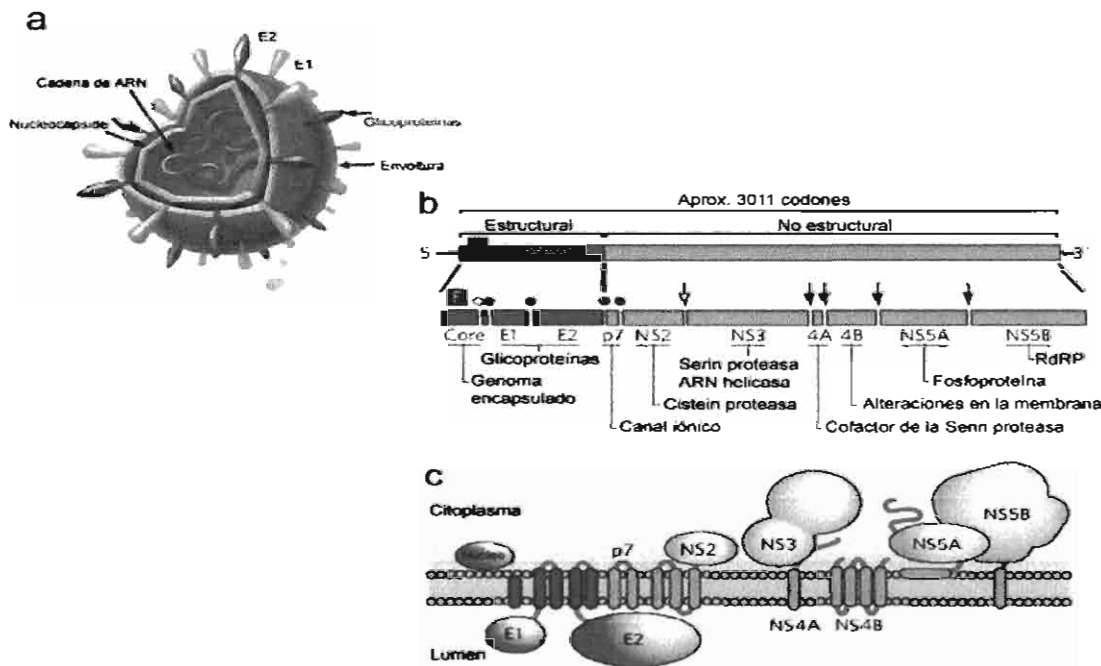


Figura 3. Estructura del VHC y productos génicos. A. Morfología del VHC. La cubierta consiste de 2 proteínas las cuales forman espigas (E1 y E2), dentro de la cubierta se encuentra la nucleocápside que es parecida a un icosaedro. B. Estructura del genoma viral, incluyendo un marco de lectura abierto que codifica genes estructurales y no estructurales y regiones 5' y 3' no traducibles. En la parte intermedia se muestran los productos de la traducción y el procesamiento de la poliproteína. Los círculos llenos se refieren a sitios de corte de la peptidasa, los círculos abiertos se refieren a los sitios de corte péptido-peptidasa. C. Topología de las proteínas del VHC con respecto a la membrana celular. Se conoce que hay interferencia de las proteínas del VHC con ciertas vías de la respuesta inmune. Tomado de Thimme R y Lindenbach BD (18, 36)

6. Estructura proteica y funciones del VHC

La poliproteína que codifica el ARN del VHC es procesada por proteasas celulares y virales en diez diferentes proteínas. La primer proteína del extremo amino (N) terminal

es la proteína core, que constituye la nucleocápside del viron y complejos parecidos con el ARN viral. Las siguientes dos proteínas (glicoproteínas), E1 y E2 forman la cubierta, las cuales constituyen un heterodímero sobre la superficie del viron. La proteína E2 contiene un dominio importante para la unión del virus a los receptores celulares. Es la proteína que presenta la mayor heterogeneidad, en particular, en las dos regiones hipervariables del extremo N terminal entre diferentes aislados del VHC. En la actualidad la función de la proteína E1 no es conocida por completo. El complejo E1-E2 parece ser la forma funcional de la cubierta viral, la proteína E1 también interacciona con la proteína core, la cual es importante para el ensamble del virus. La siguiente proteína es la p-7, que es parte de la familia de proteínas virales, llamadas vioporinas, las cuales aumentan la permeabilidad de la membrana para promover la entrada (gemación) del virus (formando un canal iónico) a la célula (45). La ruptura de cada una de las proteínas virales se lleva a cabo por peptidasas de señalización celular durante la traducción de proteínas. Las proteínas no-estructurales (no se incorporan al viron), comprenden la proteína NS2 que es una metaloproteína, la cual requiere de iones de zinc para su actividad. La actividad de la proteasa NS2 puede ser demostrada solo cuando está unida a la siguiente proteína, la NS3, y la única función demostrada para NS2 es la auto-ruptura de la unión entre NS2 y NS3. La NS3 también es una proteasa (serín proteasa), la cual rompe en todos los dominios de las proteínas restantes, liberando así las proteínas de manera individual. Las dos terceras partes de la porción carboxilo terminal de NS3 presentan actividad de nucleótido trifosfatasa (NTPasa)/helicasa, la cual puede ser importante para la traducción del VHC y/o la replicación del ARN (36). Las estructuras

cristalinas de la proteasa NS3 y la helicasa han sido determinadas de manera separada, lo cual facilita el diseño futuro de agentes antivirales. Otra proteína, la NS4A es un cofactor que forma un complejo con NS3 que impulsa la actividad de proteasa de la NS3. La NS4B es una proteína hidrofóbica que induce la formación de una estructura vesicular citoplasmática, es una red membranosa que al parecer contiene el complejo de replicación del VHC (36,47). La NS5A es una fosfoproteína que se une al ARN y se conoce que juega un papel importante en la replicación viral ya que la mayoría de las mutaciones adaptativas de los cultivos celulares que se han descrito están localizadas en la región central de esta proteína (47). La NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN, la cual es la enzima clave de la replicación y transcripción viral. La mayoría de estas proteínas son requeridas para la replicación viral. Así mismo, son también blancos potenciales de agentes antivirales, en la **figura 3c** se observa el lugar que ocupan las proteínas en la membrana celular.

7. Replicación viral

El ARN del VHC se ha podido detectar en diferentes tejidos y fluidos de pacientes infectados, aunque la especificidad del RT-PCR (53-55). Además, la evidencia sugiere que el VHC puede replicar en células linfoides y monocitos (56-61) y se ha evaluado su influencia en la respuesta al tratamiento con IFN (62, 63). El amplio rango de manifestaciones extrahepáticas de las enfermedades asociadas al VHC como son la crioglobulinemia, el síndrome de Sjögren, púrpura, glomérulo nefritis pseudomembranosa y el linfoma de células B no-Hodgkin son manifestaciones de que el VHC replica en otros tejidos (64). En años recientes se han desarrollado

replicones subgenómicos (48, 49), y recientemente tres grupos independientes de investigadores han desarrollado cultivos celulares de partículas virales infecciosas (50-52). Estos modelos han incrementado dramáticamente nuestro conocimiento del ciclo de vida del VHC (40).

a. Internalización

El primer paso en la infección viral es la unión del virus a través de la proteína E2 a la superficie de la célula blanco. Es probable que el virus entre a la célula vía endocitosis mediada por un receptor, CD81, que es una molécula de la familia de la tetraspaninas y esta ampliamente distribuida en distintos tipos celulares (20, 65-67). La unión de E2 a CD81 puede disparar patrones de señalización, que resultan en la agregación de células linfoides e inhiben la proliferación de células B (68). Los anticuerpos contra E2 y CD81 pueden bloquear la unión del virus (69). Sin embargo, CD81 no ha sido clasificado como un receptor para el VHC, debido a que la unión no provoca internalización de las partículas virales a la célula. Así, se requiere al menos de otra molécula para la internalización de los virus. Esta segunda molécula o co-receptor debe ser más específica del hígado, lo que explica el hepatotropismo del VHC. La identidad de esta molécula no es aún conocida. Otra molécula de la superficie celular es el receptor de la lipoproteína de baja densidad que ha sido implicada como un posible receptor del VHC (Figura 4, 70, 71).

b. Replicación

Una vez que el virus entra a la célula, el ARN viral es liberado en el citoplasma y posteriormente se lleva a cabo la traducción y procesamiento de la poliproteína. La traducción del ARN de doble cadena (dsRNA por sus siglas en inglés) es modulada

por un mecanismo dependiente de IRES, ocurre en los ribosomas asociados a membrana, las proteínas NS3-5B constituyen el complejo de replicación, llamada "red membranosa" (36, 47). La replicación del ARN inicia con la síntesis de ARN de cadena negativa (la detección del ARN sentido negativo representa la evidencia definitiva de la replicación viral en las células), conduciendo a un ARN de doble cadena que sirve como molde para la progenie de moléculas de ARN de cadena positiva, las cuales entran a un nuevo ciclo de replicación/traducción o bien son empaquetadas en partículas virales por gemación en el retículo citoplasmático. Las partículas virales completas pueden ser encontradas en algunas vesículas en el citoplasma. Los viriones son liberados al espacio extracelular utilizando los patrones de secreción de las células (**Figura 4**).

La poliproteína sintetizada es procesada durante y después de la traducción. La ruptura de las tres proteínas core, E1 y E2 se lleva a cabo por peptidasas de señalización celular en el retículo endoplásmico durante la traducción. La unión NS2-NS3 se rompe por la actividad de una auto-proteasa de estas dos proteínas. Finalmente, las proteínas remanentes son rotas por la proteasa NS3-NS4A después de la traducción. Una vez sintetizada y liberada la señal de la peptidasa, la proteína core es retenida en el compartimiento del citosol, pero es asociada con membranas intracelulares debido a que la secuencia de su terminal carboxilo es altamente hidrofóbica. En contraste, E1 y E2 (y probablemente p7) son translocadas al lumen del retículo endoplásmico y glicosiladas durante el proceso. E1 y E2 forman un heterodímero y son ancladas en la membrana del retículo endoplásmico rugoso debido a que presentan señales para su retención en el retículo endoplásmico. La

mayoría de las proteínas virales están también asociadas a las membranas intracelulares en el citoplasma, donde la síntesis del ARN viral se lleva a cabo. Algunas de las proteínas virales como la core, NS5A y NS3 contienen señales de localización nuclear, y pueden ser translocadas al núcleo bajo ciertas condiciones. El significado del potencial de la fase nuclear en la infección del VHC aún es desconocido (18, 20, 22, 36).

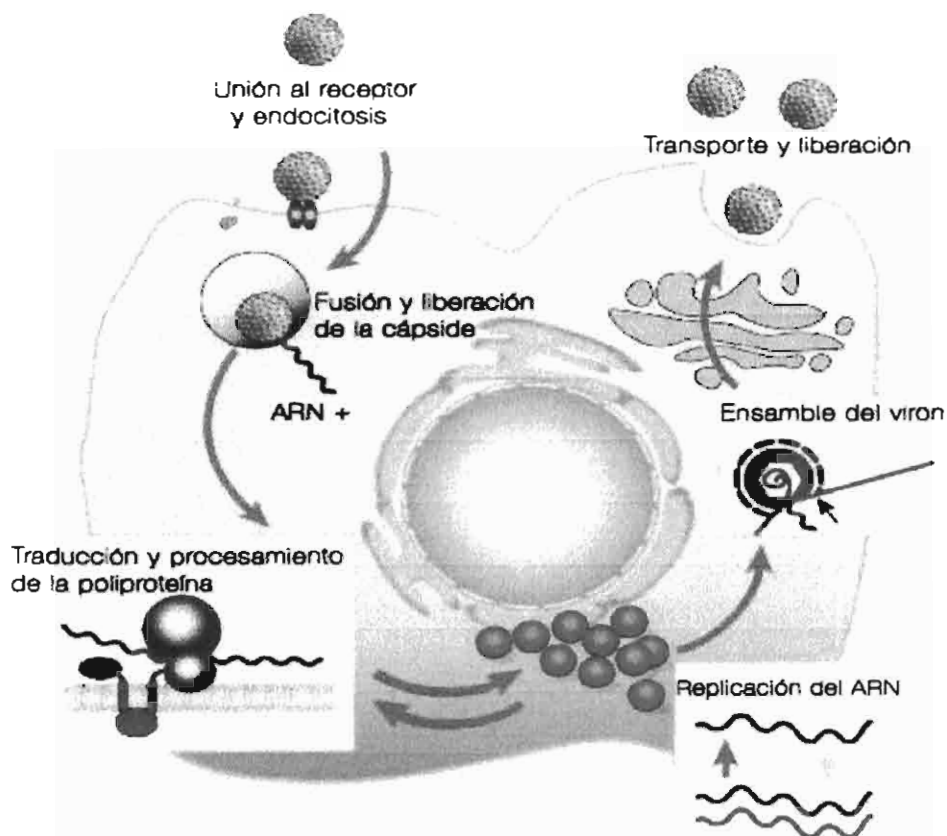


Figura 4. Ciclo de vida del VHC. Después de la entrada del virus a la célula y descubrirse, genoma del VHC funciona en 3 roles principales: traducción, replicación y empacamiento de los viriones nacientes o recientes. Tomado de Reheman (20,22) Lindenbach BD (36)

Debido a la ausencia de un intermediario genómico estable, el VHC es constante en producción de nuevos ARNs y proteínas virales para mantener la persistencia, siempre con el riesgo de ser detectada por el sistema inmune innato o adaptativo del

huésped (44). La tasa de replicación viral y la producción de antígenos en tejidos infectados se conoce que es relativamente baja al compararlo con otros virus, haciendo que la demostración directa de las proteínas virales y del ARN sea difícil. La replicación del ARN es altamente propensa a error, debido a la falta de función de prueba de lectura de la proteína NS5B, la cual ha generado una gran diversidad genética. Para finalizar, el complejo de replicación viral tiene alta resistencia a proteasas y nucleasas *in vitro* por lo que es probable que ayude a ocultar y proteger el dsARN de la detección por el sistema inmune innato. En adición a estas estrategias de evasión pasivas, las proteínas virales core, NS3, NS4 y NS5A juegan un papel activo en la interferencia con la inmunidad innata (10, 17-19, 21, 22, 36)

8. Funciones accesorias de las proteínas virales

Al mismo tiempo que las diferentes proteínas virales tienen funciones que están involucradas en la replicación viral, también tienen otras actividades accesorias, las cuales no necesariamente están ligadas con la replicación del virus pero pueden afectar la patogénesis contribuyendo a la alteración de las funciones celulares del huésped (10, 36, 72) Se ha demostrado que la proteína core se une a los dominios citoplasmáticos del receptor del TNF- α y del receptor de la linfoxina- β , provocando alteraciones en la sensibilidad celular a estas citocinas. Los efectos precisos de la proteína core varían, ya que se han reportado tanto incremento como reducción de la sensibilidad a estas citocinas. La proteína core también se une a varias proteínas celulares que pueden servir como factores de transcripción, incluyendo la hnRNPK y la ARN helicasa, así la proteína core puede activar la transcripción de genes

reporteros bajo el control de varios promotores, incluyendo promotores celulares como c-myc, c-fos y otros promotores virales. En cultivo primario de fibroblastos embrionarios de rata, la proteína core también tiene actividad transformante, se ha observado que coopera con el oncogén c-ras y también suprime la respuesta citotóxica de células T (10,36).

La proteína E2 se une a la molécula de CD81 y puede disparar señales de traducción de las células, especialmente en linfocitos (67). Así, teóricamente el VHC puede alterar la función normal de una célula aún cuando está sea de un tipo celular incapaz de infectarse (68). La proteína E2 se une e inhibe a la protein cinasa R (PKR), proteína con actividad anti-VHC siendo un importante mediador de la acción del interferón en la inhibición de la traducción viral (69). La PKR también está involucrada en apoptosis, por lo que E2 puede inhibir la apoptosis, facilitando la persistencia del virus y la oncogénesis. Se ha demostrado que E2 puede activar otros factores de transcripción de genes de respuesta al estrés como la proteína reguladora de la glucosa grp78 (18).

La proteína NS5A también se une al sistema PKR vía una secuencia denominada región determinante a la sensibilidad al interferón, lo que confiere resistencia a los efectos antivirales del fármaco (73). La NS5A tiene la capacidad de unirse a otras proteínas celulares, incluyendo la proteína reguladora del crecimiento y a una proteína transportadora de vesículas. La unión de estas proteínas con NS5A perturba las funciones de estas moléculas. La NS3 se une a las cinasas A y C y puede tener actividad oncogénica (36).

9. Patrones de ARN del VHC durante diferentes condiciones clínicas de la infección

En la actualidad no es claro si un “estado de portador asintomático” corresponde al paciente con una histología hepática normal pero con replicación viral. La mayoría de los sujetos infectados crónicamente muestran una hepatitis crónica activa de gravedad variable (25). Existen imprecisiones con respecto a la historia y curso de la infección viral, en particular, en el estado agudo de la infección, en los países del Occidente no hay evidencias contundentes acerca del papel del VHC en la hepatitis fulminante en ausencia de co-infección con el virus de la hepatitis B (VHB). Esto contrasta con algunos reportes en Asia donde en varios casos han implicado al VHC, aún en ausencia de VHB (22).

La multiplicación del VHC es sostenida, mostrando títulos estables o incrementados del ARN viral durante el curso de la infección crónica y el desarrollo a largo plazo de cirrosis y carcinoma hepatocelular. El nivel de viremia del VHC es generalmente bajo durante la infección crónica (10^5 - 10^7). Sin embargo, estudios de cinética del ARN-VHC sérico durante el tratamiento con IFN $-\alpha$ sugieren un recambio alto de las partículas virales (41, 42). Más aún, la influencia de la carga viral en el curso de la infección por VHC no ha sido establecida, y la mayoría de los estudios no han mostrado alguna diferencia significativa en la carga viral plasmática entre pacientes con hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular. La interpretación puede ser moldeada de manera tal que la viremia del VHC se incrementa en sujetos inmunodeprimidos y se correlaciona con la gravedad de la hepatitis crónica. Esto ha sido establecido, principalmente en pacientes trasplantados de hígado. La carga viral

intrahepática no necesariamente correlaciona con los niveles séricos de viremia y además otros factores ambientales pueden modificar la replicación del VHC (36).

Dado que la multiplicación del virus continúa durante el curso de la infección crónica, el tratamiento debe ser usado aún cuando la cirrosis ya se haya establecido, siempre y cuando el paciente esté compensado.

La erradicación completa del virus es teóricamente posible, dada la ausencia de moléculas de ADN integradas.

Debido al patrón de replicación así como a su alta variabilidad genética, el VHC desarrolla estrategias eficientes para persistir y escapar al efecto de los tratamientos actualmente disponibles. Esto reduce significativamente la eficiencia de la terapia antiviral por lo que es necesario ampliar el conocimiento para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra diferentes proteínas virales y combinaciones que tengan mayor eficiencia en la eliminación del virus.

10. Bases Moleculares de la persistencia del ARN del VHC

El ARN viral es variable genéticamente y presenta un rango estimado de cambio de nucleótidos de 10^3 sustituciones/sitio/año. Este valor ha sido determinado por análisis secuenciales de sueros colectados a diferentes tiempos en pacientes infectados y en chimpancés. Esta variabilidad puede ser observada en todos los dominios de ARN del VHC, pero predominantemente en la proteína de envoltura E2 donde hay una secuencia hipervariable (HVR)-1, localizada en el extremo 5' de este dominio con una alta proporción de mutaciones que involucran cambios en los aminoácidos (74). Algunas de las proteínas no estructurales, en particular la NS5A, así como las

secuencias que codifican para la cápside muestran una pequeña, pero significativa tasa de mutabilidad (73). En contraste la región 5' no traducida es altamente conservada entre las diferentes muestras aisladas, aunque se han encontrado mutaciones en algunos sitios. (36)

Existe un acuerdo general en que la respuesta a la terapia con IFN- α depende de la severidad de la lesión hepática y del genotipo de VHC que está infectando. Así, se considera que infecciones con el VHC genotipo 1b y una alta viremia pueden ser factores predictivos de una baja respuesta a tratamiento, en nuestro país éste es el genotipo que se presenta con mayor frecuencia en los pacientes infectados. Se considera también que el ARN del VHC puede circular como poblaciones de moléculas de ARN que pueden diferir en el suero y en el hígado. Estos genomas virales se han producido a partir de un genoma original que ha sufrido mutaciones puntuales y están incluidas en un mismo subtipo del VHC. Se ha sugerido que la presencia de estas quasiespecies antes del tratamiento se correlaciona con una baja respuesta al IFN- α . El desarrollo de las quasiespecies tiene una variedad de consecuencias biológicas, incluyendo el desarrollo de mutantes que escapan a la inmunidad celular y humoral, la generación de partículas virales "defectuosas", tropismo celular variable y el desarrollo de resistencia a drogas (44, 16). Varios estudios han analizado en detalle la cinética e impacto de las quasiespecies del VHC durante el curso natural de la infección, algunos muestran un paralelismo entre la complejidad genética y la gravedad del daño hepático, siendo independiente de la viremia y el tiempo de duración de la infección (40, 41, 43, 44).

Los virus son patógenos altamente infecciosos que requieren de la maquinaria celular del huésped para sobrevivir y replicarse. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra la invasión por un patógeno. Dos eventos requeridos para activar una respuesta inmune innata efectiva son: a) el descubrimiento de la invasión viral por receptores del sistema inmune y b) la iniciación de la cascada de señalización proteica que regula la síntesis y secreción de interferones tipo I (IFN- α y IFN- β) (17-19), los cuales exhiben funciones antivirales, inmunomoduladoras, y anti-proliferativas (**figura 4**).

11. Inmunopatogénesis de la hepatitis C

El conocimiento de la patogénesis de la hepatitis C crónica es crucial tanto para la determinación de una terapia antiviral exitosa como para encontrar una vacuna, sin embargo es pobremente conocida. La infección por el VHC y su curso dependen del balance entre la tasa de replicación del virus y la rapidez, especificidad y efectividad de la respuesta inmune del huésped (16, 75-78, 101). A diferencia del VHB, el VHC es un virus que evade el reconocimiento inmune efectivo y/o inhibe la respuesta inmune del huésped, a través de mutaciones en sitios antigénicos que pueden ocurrir bajo presión selectiva durante la respuesta de los linfocitos B o T y así servir como un mecanismo para establecer la persistencia del VHC (22, 79, 80). Inmediatamente después de la infección por el VHC, el virus replica eficientemente, induciendo la producción de interferones tipo I, sin embargo el rápido incremento en la replicación viral es ignorado por la respuesta inmune adaptativa y después de un intervalo corto de exposición al virus, la carga viral puede alcanzar niveles comparables a aquellos

de los pacientes que establecen infección persistente (23, 81). Existen varias teorías concernientes a este tema, incluyendo la citopaticidad del VHC (21), la mayoría de los autores declaran que la patogénesis tiene una naturaleza inmunológica, que involucra a CTLs que son la principal defensa del huésped contra la infección por VHC (82-87) y un mecanismo indirecto que implica citocinas en el daño hepático inducido por el VHC (75, 76, 88).

La respuesta inmune contra el VHC es policlonal y multiespecífica, en términos tanto de anticuerpos como de respuesta inmune celular. Individuos que se recuperan de una infección aguda tienen una respuesta proliferativa de células CD4+ más vigorosa contra una o más proteínas del VHC comparada con aquellos individuos que desarrollan una enfermedad crónica. Las células CD8+ participan en limitar la replicación viral. Estas respuestas son insuficientes para erradicar al virus, sin embargo causan daño hepático y así se establece la infección crónica. (77, 89, 90). Se ha encontrado que la carga viral en el hígado correlaciona inversamente con la respuesta inmune específica al virus. Esto es, en pacientes respondedores a tratamiento, las células CD4+ muestran niveles de ARN-VHC hepáticos más bajos, la frecuencia de las células T tienden a ser mayores en aquellos pacientes que tienen niveles de carga viral hepática bajos. Sin embargo, se considera que si ocurre una insuficiente o inadecuada respuesta de células T (CD4+ y CD8+) específicas del virus, el ARN-VHC persiste en células T hepáticas aún en aquellos individuos que alcanzan respuesta viral sostenida (recuperados) (91, 92, 93).

En el cerebro después de una infección viral, existe una relación entre el sistema inmune principalmente por la acción de las células T y la persistencia del virus en el

cerebro. El virus ha desarrollado varias estrategias para escapar a la erradicación mediada por las células T, incluyendo la interferencia con la vía de presentación de las MHC clase I del huésped o teniendo un "escondite" en células a las cuales les falta la expresión de MHC clase I. Esto puede resultar en larga vida del virus en el cerebro, un estado que probablemente es controlado de manera activa por linfocitos T. Bajo intensa inmunosupresión, sin embargo, la reactivación de la replicación viral puede ocurrir, lo cual es una amenaza letal para el huésped (94).

El VHC se encuentra en CMNs, las cuales son un reservorio extrahepático del virus (56-61, 63, 95,96) y en los linfocitos infiltrantes en el hígado (20, 22,36, 60,97). Se ha observado por hibridación *in situ* que el ARN viral está presente en aproximadamente el 1% de las linfocitos en nódulos linfáticos, además las CMNs de individuos sin infección pueden ser infectadas por el VHC (95). Las células infectadas pueden convertirse en una fuente de replicación viral periférica y así favorecer la selección y persistencia de variantes genómicas del VHC. El impacto real que tiene la presencia del virus en células diferentes a los hepatocitos sobre la calidad de la respuesta inmune es desconocida (17, 18, 33).

La liberación de TNF- α y Fas ligando (Fas-L) es el mecanismo que utilizan los CTLs para matar las células infectadas. Esto es, el sistema TNF- α es un mediador importante de la respuesta en cascada de citocinas por las células T, además tiene un papel clave en la progresión de la enfermedad y en el resultado de la terapia en la HCC. El TNF - α es una citocina pro inflamatoria y es secretada primeramente por macrófagos activados y linfocitos T en respuesta a la infecciones virales incluyendo hepatitis C. Este puede inhibir la replicación viral o inducir a la apoptosis de células

infectadas, y algunos virus tienen estrategias avanzadas capaces de bloquear el efecto antiviral del TNF- α . Además contribuye en la coordinación de la actividad de las células inmunológicas. Por lo tanto, el TNF- α tiene un papel dual en la infección por el VHC, está involucrado tanto en mecanismos responsables de la eliminación del virus así como en la patogénesis de la infección crónica por VHC. (20, 36, 86, 88, 98-100).

Las células del sistema inmune innato expresan patrones de receptores de reconocimiento (PRRs) que detectan estructuras moleculares compartidas por patógenos de varios orígenes (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs). Los receptores "Toll Like" (TLR, por sus siglas en inglés) 3, 7, 8 y 9 son los principales PRRs que reconocen diferentes tipos de ácidos nucleicos derivados del virus y activan la cascada de señalización que resulta en la inducción de IFNs tipo I. Recientemente, genes inducibles por el ácido retinoico I (RIG-I) han sido identificados como receptores citosólicos para dsRNA. Los RIG-I inducen IFN en respuesta al dsARN viral intracelular de manera independiente a los TLRs. Por consiguiente, existen dos sistemas de receptores para detectar la presencia de un virus y montar la respuesta inmune, los cuales son localizados en diferentes compartimentos dentro de una célula y reconocen diferentes ligandos (Figura 5; 5, 7, 8).

Los TLRs pueden alertar diferentes tipos celulares del sistema inmune innato, ocasionando una mayor sensibilidad y una respuesta rápida a un rango amplio de patógenos. Además la identificación de receptores inhibitorios específicos de moléculas clase I del MHC en las células NK y un número de receptores y co-receptores activados que reconocen ligandos expresados en células blanco, dan

como resultado un mejor conocimiento de los mecanismos generales involucrados en la función celular de las NKs y la capacidad para discriminar entre células normales y dañadas.

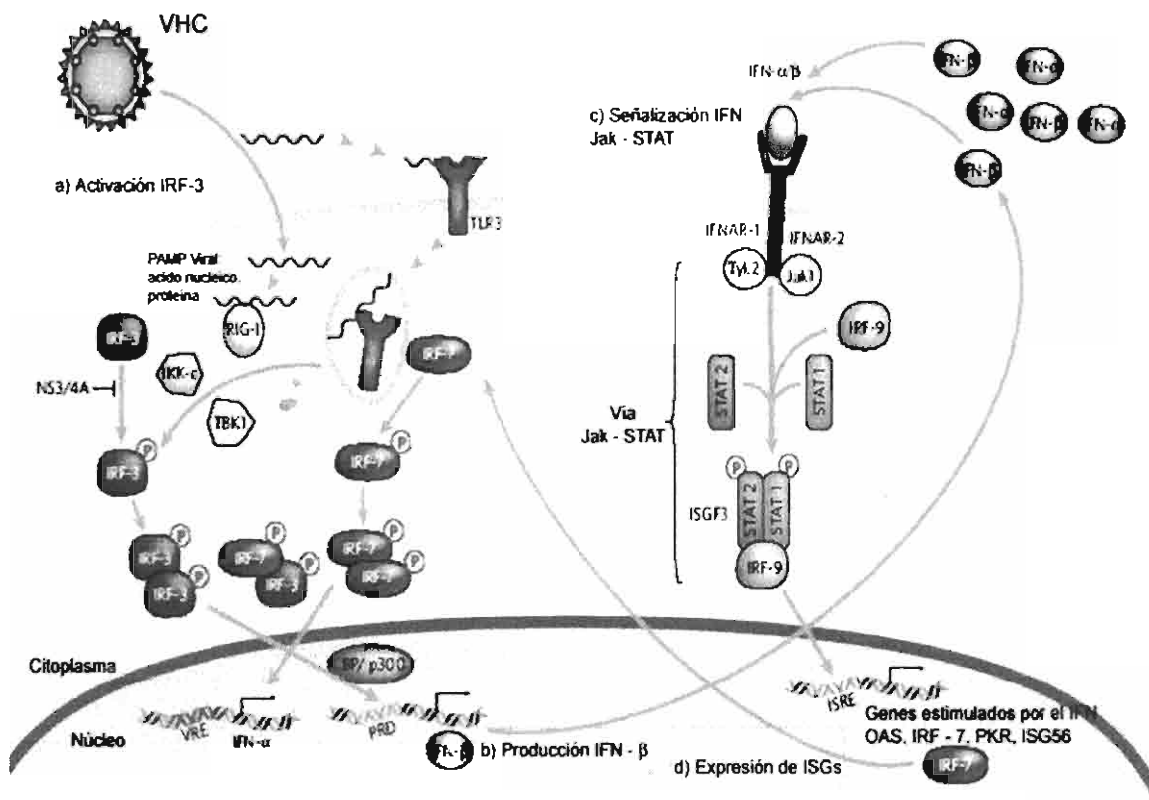


Figura 5. Procesos moleculares de la respuesta del huésped a la infección por VHC. A) Los PAMPs virales (ARN del VHC) se unen a RIG-I o TLR3 resultando en la fosforilación y activación de IRF-3 por las protein cinasas TBK1 o IKK-ε. El dímero fosforilado de IRF-3 se transloca al núcleo celular, interactúa con sus patrones de transcripción, incluyendo CBP/p300 y se une al dominio regulador positivo de ADN conocido (PRD) en la región promotora de genes blanco de IRF-3, incluyendo IFN-β. b) La activación de IRF-3 resulta en la producción de IFN-β y su secreción de las células infectadas. Tomado de Gale Jr M (10)

Varios estudios han adicionado un concepto importante, la inmunidad innata y adaptativa no son dos mecanismos de defensa separados, están estrechamente interconectados uno del otro, y determinan el resultado a la infección por patógenos (36, 101, 102). Así, la inmunidad innata gracias a sus mecanismos efectores rápidos,

no solo precede a la inmunidad adaptativa, sino que ejerce un importante control en el tipo y calidad de la respuesta dada por los linfocitos T y B (75). Es notable que a pocos días de la infección primaria, la defensa se debe a la inmunidad innata que se basa en la respuesta eficaz de células T que requiere de 3 a 5 días, mientras que la respuesta adaptativa (producción de anticuerpos) necesita más de una semana. Los mecanismos inmunes innatos pueden controlar las infecciones antes de la intervención de la inmunidad específica, por consiguiente, la inmunidad innata puede terminar con la mayoría de las infecciones que contraemos antes de manifestar la enfermedad e iniciación de la respuesta específica. (75, 103)

Las células NK y las DC son responsables de la respuesta inmune del huésped a los antígenos virales y también de la presencia o eliminación del virus (16,17, 18, 22,32, 36, 102, 104). Después de la infección aguda, hay un periodo inicial durante el cual se decide el resultado a largo plazo y como ya se ha mencionado la resolución de la infección depende de la replicación del virus y de una adecuada respuesta inmune del huésped (16, 75-78, 101).

Una vez que las NKs reconocen a las células infectadas las destruyen a través de su actividad citotóxica, y rápidamente producen grandes cantidades de IFN- α para activar la respuesta inmune celular (105-107), la actividad de las NKs es regulada por un balance entre receptores inhibidores y estimuladores (108, 109). La inmunidad adaptativa está fundamentalmente compuesta de la respuesta inmune humoral (producción de anticuerpos por linfocitos B) y lo más importante en infecciones virales, la respuesta inmune celular, que involucra linfocitos T tanto CD4+ (cooperadores, por sus siglas en inglés Th) que pueden originar una respuesta Th1 o

Th2 dependiendo de las citocinas que produzcan, como CD8+ (citotóxicos, por sus siglas en inglés, CTLs), su efectividad determina el resultado de la infección, los CTLs reconocen péptidos que han sido sintetizados en los compartimentos citosólicos del huésped a través del procesamiento y degradación de proteínas virales (16-18, 22, 87, 102, 110). Los linfocitos CD4+ reconocen antígenos presentados por moléculas clase II del MHC en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC), posteriormente realizan múltiples funciones efectoras incluyendo activación de macrófagos y células B así como la activación de linfocitos T CD8+ de manera dependiente de citocinas (75, 76, 111). En pacientes infectados en etapa aguda se demuestra una respuesta fuerte, multiespecífica y sostenida de linfocitos Th la cual se asocia con un curso autolimitado de la infección (18). Los CTLs reconocen antígenos presentados por moléculas clase I del MHC en la superficie de células infectadas, subsecuentemente, realizan diferentes funciones efectoras en estadios tempranos o agudos de la enfermedad, tales como eliminar células blanco infectadas y la secreción de citocinas como IFN- α y TNF- α las cuales pueden inhibir la replicación viral sin eliminar a la célula infectada, por consiguiente los CTLs participan en el control de la infección por VHC. (87, 110-112). Esto último refleja el potencial curativo de los linfocitos T CD8+, que se pensaba que únicamente tenían actividad citotóxica (18, 75, 76, 110). Actualmente se reconoce que en ausencia de una recuperación virológica completa, las CTLs pueden ejercer efectos dañinos en hepatocitos no infectados, ocasionando inflamación, necrosis y hepatitis fulminante (76, 87). Es probable que el componente más importante sea algún aspecto de la selección de los epitopes a través de MHC del huésped (109, 113). Es importante conocer la

inmunidad del huésped, y detallar cuales son los péptidos involucrados en la respuesta de los linfocitos T a la infección viral. En infección crónica la respuesta de las células T es policlonal y específica aunque no lo suficientemente fuerte para eliminar el virus (79). Como se mencionó antes, el efecto de la presión inmune sobre la HVR1 de la proteína E2 puede ocasionar diferentes respuestas: mínima presión ocasiona persistencia viral, mayor presión resulta en eliminación del virus y muy fuerte presión induce falla hepática severa (31)

El papel del IFN- α en la eliminación del virus es apoyado por los hallazgos en el modelo de replicación. En chimpancés infectados en etapa aguda se demostró que la eliminación viral transitoria o sostenida se asoció con un aumento de genes inducidos por IFN- α en el hígado (18, 83).

La eliminación del virus se asocia con una fuerte respuesta de las células Th. La persistencia viral puede ser por una respuesta inmune antiviral débil, con la consiguiente incapacidad para erradicar las células infectadas (76, 111). El VHC evade la inmunidad a través de varias estrategias incluyendo entre otras la interferencia viral con el procesamiento y presentación de antígenos, inhibición de vías de señalización celular y la generación de variantes virales que escapan a la inmunidad celular y humoral (10,16-22, 75-80, 90, 110, 114). La infección por VHC resulta en la producción de anticuerpos a varias proteínas virales en casi todos los pacientes inmunocompetentes. Los anticuerpos específicos para VHC son usualmente detectables en aproximadamente 7-8 semanas después de la infección. El papel de estos anticuerpos en la protección ha sido cuestionado, ya que no previenen la reinfección y no correlacionan con resultados favorables (10, 18).

12. Propiedades inmunomoduladoras de las citocinas

El sistema inmune tiene un impacto diverso y complejo en todos los tejidos y células de un organismo. Un grupo heterogéneo de péptidos multifuncionales regulatorios, pleiotrópicos y glicoproteínas con pesos moleculares que van de 8 hasta alrededor de 45 kDa, colectivamente llamadas citocinas, forman parte clave de la red compleja que regula las respuestas inmune e inflamatoria (115, 116). Las citocinas son producidas virtualmente por todas las células nucleadas del cuerpo, incluyendo todos los tipos celulares del hígado, juegan un papel crítico en la comunicación y activación celular. Además han emergido como elementos clave en la mayoría de las enfermedades hepáticas agudas y crónicas (117). Varias citocinas tienen un papel en varios aspectos de las enfermedades, son mediadores proximales de inflamación, muerte celular, colestasis y fibrosis (100, 117-121, 125, 126), pero paradójicamente son también mediadores de la regeneración hepática después de algún daño (122-124).

El hígado es una fuente de muchas citocinas que pueden influenciar el desarrollo de enfermedades hepáticas (100, 125-131), sus receptores se encuentran en los hepatocitos. En pacientes con HCC se ha observado un incremento de la expresión de citocinas intrahepáticas como: TNF- α , interleucina (IL)-1 α y β , IL-2, IL-6, IFN- α/β , y algunas quimiocinas como CXCR3 y CXCL8-10 (20,88, 98, 100, 125-131); además existe una interrelación entre los diferentes tipos celulares que se encuentran en el microambiente hepático (**Figura 6**). También las células mononucleares de sangre periférica (CMNs) producen varias citocinas que están potencialmente involucradas en el daño hepático inducido por el VHC.

Las citocinas producidas por las células T son importantes en el control de la replicación viral del VHC (126). Cuando sucede la infección viral, la interacción de las proteínas de la superficie viral con las proteínas de la superficie celular inician una reacción en las células que conduce a la primera onda de producción de citocinas. Las citocinas y quimiocinas juegan un papel central en la respuesta del huésped así como en la inmunopatología asociada a las infecciones virales.

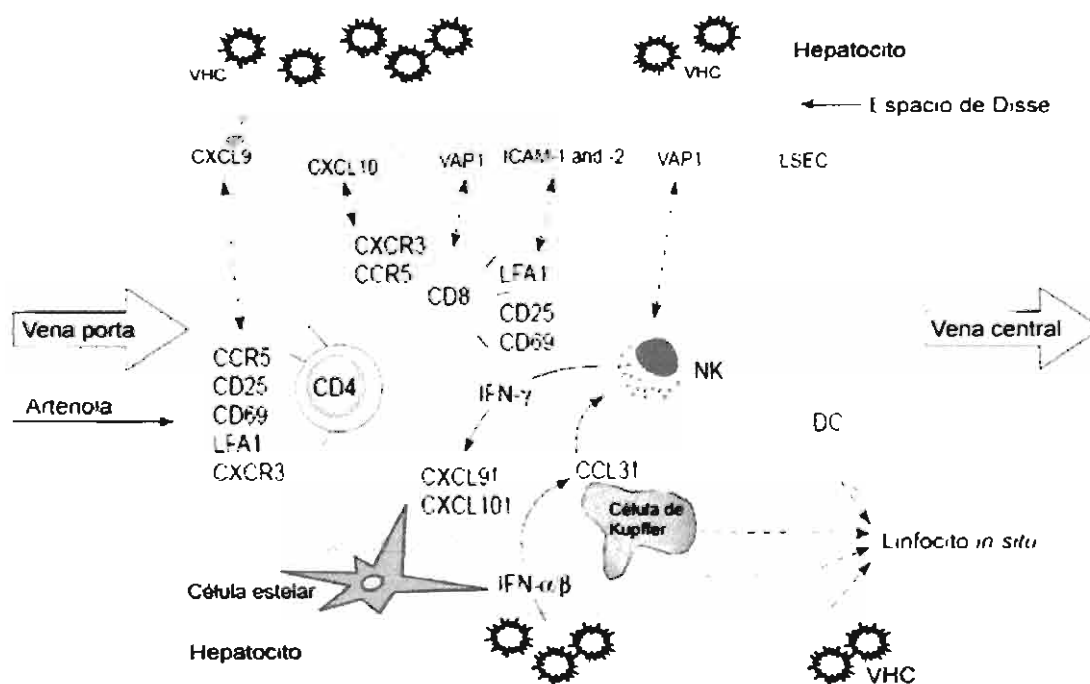


Figura 6. Microambiente sinusoidal y reclutamiento de células T en el hígado infectado por el VHC. Tomado de Racanelli V y Rehermann B (20).

Las citocinas han sido clasificadas en pro-inflamatorias (Th1) o antiinflamatorias (Th2) dependiendo de sus efectos en el sistema inmune. Impactan una variedad de tejidos de manera compleja regulando la inflamación, la muerte y la proliferación celular y la migración así como los mecanismos de cicatrización (115). Interferones, interleucinas, factores de crecimiento, factores de necrosis tumoral, quimiocinas forman parte de las

citocinas. Las principales citocinas Th1 (pro-inflamatorias) son TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, e IFN- γ , mientras que las principales Th2 (anti-inflamatorias) son IL-4, IL-5 e IL-10. Se ha descrito que CXCL8 o IL-8 es una quimiocina que juega un papel importante en la eliminación de virus y el proceso inflamatorio, esta quimiocina atrae neutrofilos al sitio de infección o daño. La IL-12 activa NK y células T cooperadoras induciendo inmunidad celular. En general, citocinas Th1 inducen citocinas Th1 e inhiben la producción de citocinas Th2 y viceversa. Esto crea un proceso de señalización complejo y diverso que regula la respuesta tisular al daño, la inflamación y la cicatrización.

Ciertas citocinas contribuyen a la defensa del huésped contra la infección, por la coordinación de los mecanismos efectores que interfieren con el ciclo de vida del VHC. Las citocinas tipo Th1 son requeridas para la generación de los CTLs y la activación de las NK, las citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ producen una respuesta aguda auto-limitada, teniendo un papel central en la defensa del huésped contra patógenos intrahépatos como el VHC. Además son capaces de eliminar el virus y así el individuo recuperarse de la infección aguda. Sin embargo, si las citocinas Th1 no se encuentran bajo control, tienen la capacidad de causar daño hepático al producir una actividad inflamatoria y contribuir a la muerte celular por necrosis (76).

Cuando la infección persiste a pesar de una respuesta Th1 fuerte es por una alta tasa de mutación del virus, ocasionando que el VHC escape de la vigilancia inmunológica, las cepas desarrollan resistencia a los efectos de citocinas producidas por CTLs específicos para el VHC. En la infección persistente, las células Th1 continúan liberando TNF- α , IFN- γ , IL-2 causando inflamación y necrosis. Los CTLs a través de

la producción de TNF- α se involucran en la necrosis independiente de los macrófagos, amplifican el daño en las células no infectadas que se encuentran cercanas al sitio. Las citocinas Th2 (IL-4, IL-10) inhiben la actividad de las Th1 y pueden tener un papel en la protección del huésped versus las consecuencias potencialmente dañinas de células Th1 (76, 88, 98).

En la infección crónica por VHC existe una respuesta inflamatoria, parte de ella mediada por citocinas, las tipo pro-inflamatorias en general ocasionan una respuesta que ocurre fundamentalmente en el hígado pero también puede suceder a nivel periférico, en células T y monocitos. Además, las células T que actúan de forma específica contra el VHC se convierten en no respondedoras y es aparente que desaparecen, a través de varios mecanismos, tales como; mutaciones en epítopes críticos que permiten el escape del virus, ayuda insuficiente, anergia clonal o expansión de células T reguladoras. Los linfocitos citotóxicos matan a las células infectadas por el VHC a través de la vía perforina/granzima, pero además liberan Fas-L y citocinas inflamatorias como IFN- γ . Las moléculas efectoras solubles liberadas colaboran en el control de la hepatitis C, pero además destruyen células hepáticas no infectadas y después pueden atraer linfocitos sin especificidad para el VHC e invadir el hígado. El daño de estas células inflamatorias no específicas puede expandir el daño tisular disparado por la infección del VHC y finalmente activar la fibrogénesis (90). La IL-1 α y β , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18, IL-10, TNF α y el receptor de IL-2 (IL-2R) coparticipan en la patogénesis de la hepatitis C crónica y son usadas para evaluar el efecto del IFN- α en el status inmune de los organismos, muchas de ellas se han

considerado importantes (por ejemplo IL-10 y IL-2R) para predecir la eficacia antiviral del IFN- α (76, 88, 132-138).

13. Estrategias de evasión viral

El VHC tiene mecanismos sofisticados de escape al reconocimiento de las respuestas inmunes tanto innata como adaptativa del huésped, ya que el 85% de los pacientes infectados con VHC desarrollan una infección crónica, y más del 60% de esos pacientes no responden a la terapia con IFN- α más Ribavirina o sufren una recaída al suspender el tratamiento (10, 21, 30, 36). Se ha establecido que cierta proporción de pacientes pueden eliminar la infección de forma espontánea, es usual dentro de los primeros meses después de la infección. Las tasas de eliminación espontánea son del 14-46%. Se han identificado factores virales y del huésped que juegan un papel en la eliminación (y por tanto en la persistencia) del patógeno (139-141).

a) Evasión de la respuesta inmune innata

Se ha descrito que los factores antivirales que pueden contribuir a la persistencia viral son entre otros: A) Inhibición viral del procesamiento o presentación del antígeno. B) Modulación de la respuesta a mediadores citotóxicos. C) Tolerancia inmunológicas a antígenos del VHC. D) Inactivación por mutaciones de epitopes de los CTL (20). A continuación se describen con detalle los mecanismos que el VHC ha desarrollado para evadir la respuesta inmune del huésped (17-22, 36).

El VHC es muy eficiente para inhibir la respuesta a la terapia antiviral a múltiples niveles. Últimamente se ha descubierto que la proteasa NS3/4A corta dos proteínas adaptadoras que son importantes para la inducción del IFN- α a través de la vía

clásica intracelular (IPS-1, por sus siglas en inglés) y la vía endosomal dirigida por TLR3 (TRIF, por sus siglas en inglés). Esta proteína es un factor clave para interrumpir la activación de IRF-3 que por otro lado resulta en la transcripción del gen de IFN. Además, NS3 interactúa con TBK1 inhibiendo su asociación con IRF-3 y su activación (142). Con respecto a la respuesta al IFN- α , se ha mostrado que la expresión del genoma viral completo o la proteína core suprimen la transducción de señales del IFN, tal vez, debido al aumento de la protein fosfatasa 2A, resultando en una asociación de STAT1 con su inhibidor PIAS1. Se ha encontrado que la proteína core interfiere con la vía de Jak/STAT y es capaz de activar a SOC-3 que es un inhibidor de la señalización de Jak-STAT, por consiguiente contribuye al bloqueo de la señalización del IFN que induce el VHC (**Figura 5** 17-19, 36)

El VHC directamente contraataca la respuesta antiviral del IFN- α . La proteína NS5A, tiene una multitud de funciones en la replicación del virus, además juega un papel clave en el escape de acciones antivirales del IFN- α (73). Un segmento de 40 aminoácidos en NS5A, llamado región de sensibilidad al IFN- α (ISDR), se ha asociado con la respuesta a la terapia con IFN- α . Se ha encontrado que la NS5A directamente se une y reprime a PKR y su interacción involucra la ISDR (143), pero existen controversias porque otros grupos no han encontrado esta asociación e inhibición de la PKR (144), aunque es claro que la NS5A reduce los efectos antivirales de IFN- α (36, 145). La NS5A y la proteína core inducen CXCL-8/IL-8, una quimiocina que inhibe las acciones antivirales del IFN- α (137, 145, 146), se han detectado niveles elevados de IL-8 en el suero de pacientes no respondedores a tratamiento con IFN- α (137).

Además NS5A interfiere la vía de 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2-5 OAS) / RNasa L debido a la unión que forma con 2-5 OAS. (147,148). Por lo tanto, las secuencias genómicas de VHC de cepas resistentes a IFN- α tienen menos sitios de reconocimiento a RNasa L que aquellos más sensibles, esto le permite al virus escapar del corte nucleolítico. La actividad de PKR es además modificada por el IRES y la proteína E2 del VHC (149).

El VHC tiene estrategias para evadir la respuesta de las células NK. Recientemente se ha sugerido que las células NK tienen un papel importante en la respuesta celular temprana a la infección por el VHC (109), que probablemente se debe a un umbral bajo de activación de las células NK, las cuales facilitan la eliminación del virus. Además se ha demostrado que la proteína E2 se entrelaza al receptor CD81, y así inhibe la citotoxicidad y producción de IFN- γ por células NK (106, 107). Se han descrito otras anormalidades como número reducido y desajuste funcional de las células NK en pacientes infectados crónicamente con VHC (150, 151).

b) Evasión de la respuesta inmune adaptativa.

Los mecanismos responsables de la evasión del VHC a la respuesta inmune adaptativa son parcialmente conocidos. Varios mecanismos relacionados con la falla de las células T específicas al virus conducen a la persistencia del virus, la mayoría han sido pobremente definidos (10, 16-22, 36, 90, 126). La falla primaria para inducir a las células T al aumento o al agotamiento de la respuesta vigorosa inicial son importantes predictores de la persistencia viral (110). Varios estudios han demostrado que los pacientes con infección aguda o crónica por VHC tienen una respuesta débil de células T CD4+ y CD8+ específicas al virus. Además, la pérdida directa

(agotamiento) de estas respuestas en hepatitis aguda ha sido demostrada en pacientes infectados que se encuentran en etapa aguda, los cuales de forma transitoria controlan el virus pero subsecuentemente permite la persistencia viral. Hasta el momento los mecanismos responsables de la falla primaria de las células T aún son inciertos (17-22, 90). Otra explicación del agotamiento de las células T puede ser la delección de células T específicas del virus en presencia de permanente carga viral alta (90).

Se desconoce con exactitud cual es el grado de contribución de la disfunción de las células dendríticas en la persistencia viral. (18)

El escape mutacional es una de las principales estrategias de evasión viral. El VHC replica a una tasa enorme de alrededor de 10^{12} viriones por día debido a la acción de su RNA polimerasa dependiente de RNA a la que le falta la función de corrección de lectura, favoreciendo la selección Darwiniana de variantes del virus por respuesta inmune celular y humoral (110). Desde luego el resultado de la infección en humanos es precedido por cambios en la secuencia de la región hipervariable de la glicoproteína E2, el principal blanco de la respuesta a anticuerpos que ocurre al mismo tiempo que la seroconversión de los mismos. Esto es, los cambios en la secuencia se ha sugerido que representan mutaciones de escape dentro de los posibles epitopes de las células B. Desde luego, el escape viral ocurre típicamente en la presencia de una respuesta de CTL que esta enfocada en un solo epitope viral. Los factores inmunológicos y virológicos que determinan la ocurrencia de mutaciones que colaboran al escape viral y el desarrollo de la persistencia del virus no son totalmente conocidos (90, 110, 152).

Otro posible mecanismo de evasión inmune es la anergia funcional de células T específicas del virus. Se ha demostrado que existe mal funcionamiento de las T CD8+ tanto en infección por VHC aguda como crónica. Estas células pueden estar dañadas en su capacidad proliferativa, citotóxica y en su capacidad para secretar TNF- α e IFN- γ después de una estimulación, a esto se le conoce como fenotipo "atontado". De manera interesante, la disfunción de las células T ha sido observada en la etapa temprana de la infección aguda en todos los pacientes y es independiente del resultado virológico. En pacientes con un curso autolimitado de la infección, sin embargo, la recuperación de la función de las células T CD8+ está temporalmente asociada con un descenso de la viremia y resolución de la enfermedad. En contraste, la función de las células CD8+ permanece suprimida en pacientes quienes progresan a la infección crónica. Además, las funciones efectoras dañadas de las T CD8+ específicas del VHC se asocian con un fenotipo inmaduro de diferenciación, principalmente CD28+ y/o CD27+ indicando que ellas permanecen en una etapa temprana de diferenciación. Además, las CD8+ específicas de VHC son dañadas en su función efectora antiviral en el órgano infectado, el hígado. Se ha especulado que los mecanismos de falla de T CD8+ son resultado directo de la capacidad débil y disfuncional de las células T CD4+ específicas del virus que son comunes en la infección persistente (111). Existen evidencias que sugieren un papel importante de células T CD4+CD25+ en la supresión de CD8+ específicas del virus, algunos experimentos han demostrado que la producción de IFN- γ así como la proliferación de CD8+ específicas del virus fueron inhibidas por células CD4+CD25+ de manera dosis dependiente y por contacto directo célula-célula. Además las células T CD8+ son

reguladoras de la producción de IL-10 intrahéptica (18, 20, 36, 54, 55); aunque estos resultados puntualizan el importante papel de las células T reguladoras en la persistencia del VHC, continúa habiendo algunas preguntas importantes sin contestar, como la especificidad del antígeno y la compartimentalización de las células T reguladoras. En suma, diferentes mecanismos contribuyen a la falla de la respuesta inmune adaptativa, probablemente el escape mutacional y la anergia funcional juegan el papel más importante. La falta de células T CD4+ y/o la acción de células T reguladoras (supresoras) contribuyen a la falla de las T CD8+ específicas del virus. Un mejor conocimiento de las estrategias de evasión viral es necesario para el desarrollo de vacunas efectivas. A pesar del tamaño limitado de su genoma, el VHC ha evolucionado y desarrollado estrategias sofisticadas de sobrevivencia, por consiguiente el virus es efectivo en esparcirse en poblaciones humanas, no hay una vacuna efectiva hasta el momento y la terapia con IFN- α más Ribavirina no siempre es efectiva. Sin embargo el aumento rápido en el conocimiento acerca del escape inmune del VHC puede conducir a un mejoramiento significativo en la prevención como parte de la terapia de la hepatitis C. (17-20)

14. Terapia antiviral:

a) COLCHICINA

La Colchicina (COL) es producto alcaloide de una planta, es efectiva contra la gota y otras formas de enfermedades reumáticas (artritis reumatoide, fiebre del

Mediterráneo, enfermedad de Bechet) (153). El efecto de la COL es inhibir la migración de granulocitos al área inflamada y la disminución de la actividad metabólica y fagocítica de los granulocitos. Además es un agente antimitótico (154), anti-inflamatorio (155) y antifibrótico (156, 157, 158, 159,160), retarda el transporte de procolágena a través de microtúbulos (161) y aumenta la actividad de colagenasa (156). En ratas con cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono, la COL disminuye el malfuncionamiento y la fibrosis hepática (157).

Varios ensayos clínicos se han realizado para conocer la eficacia de la COL en pacientes con fibrosis/cirrosis tanto alcohólica como noalcohólica, los resultados han sido contradictorios ya que algunos grupos han encontrado eficacia del medicamento sobre la mortalidad (162) mientras que otros han encontrado resultados negativos (163, 164, 165, 166, 167). También se ha utilizado en modelos animales (168). La COL se ha utilizado con frecuencia en la cirrosis biliar primaria (169-177) donde condiciona una lenta progresión y mejora las pruebas bioquímicas y los niveles de inmunoglobulinas (172, 173), pero no tiene ningún efecto sobre los síntomas clínicos y la histología hepática (174). Un reciente meta-análisis reportó que la COL reduce la incidencia de las principales complicaciones de cirrosis y disminuye la necesidad de trasplante hepático (175). Además se utiliza en pacientes que tienen una respuesta incompleta al ácido ursodeoxicólico (176), sin embargo su uso debe recomendarse dentro de protocolos de investigación clínicos controlados aleatorizados (177). Existe un reporte del uso de la COL en cirrosis hepática ocasionada por el VHC en donde encuentran que el efecto antifibrótico del IFN- α es mayor que el de la COL en pacientes con HCC (158, 178)

b) INTERFERON-ALFA 2b

Los pacientes con hepatitis C son comúnmente tratados con Interferón-alfa 2b (IFN- α más Ribavirina por 6 (genotipos 2 y 3) o 12 (genotipo 1) meses. Sin embargo la respuesta viral sostenida es limitada de 30-40% con esta combinación. Las tasas de respuesta viral sostenida se han incrementado de 50-60% con la unión de moléculas de polietilenglicol (peg) al IFN α (25, 33, 179).

Los interferones son clasificados en IFN tipo I, los cuales comprenden IFN- α y β y el tipo II o IFN- γ . Los IFNs tipo I son clasificados de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y comprende un gran número de subtipos (al menos 13) de IFN- α y uno solo de IFN- β (19, 180,181). Los IFNs tipo I son un poderoso sistema de defensa intracelular contra todos los virus, todas las células nucleadas de los mamíferos son capaces de sintetizar y secretar IFN α y β en respuesta a una infección viral. Los IFNs secretados son después reconocidos por células vecinas ocasionando que expresen proteínas antivirales potentes (18, 182,183, 184). Como resultado, la multiplicación del virus es lenta o se detiene, y así el organismo gana tiempo para establecer la respuesta inmune adaptativa (17, 185), el IFN- γ es secretado principalmente por linfocitos T, células NK y macrófagos.

En un hígado infectado por el VHC, el IFN- α es producido por células mononucleares infiltrantes, células sinusoidales, células de Kupffer y en menor proporción por hepatocitos. La unión de los interferones a sus receptores celulares específicos, dispara señales intracelulares que resultan en la activación y aumento de la expresión de varios genes. Los IFN α/β activan la expresión de más de 300 genes, llamados genes estimulados por interferón (ISGs) los cuales tienen funciones antivirales,

inmunomoduladoras y/o antiproliferativas. Las proteínas inducidas por los IFNs incluyen enzimas, factores de transcripción, glicoproteínas de superficie celular, citocinas, quimiocinas y un gran número de otros factores pendientes aún de ser caracterizados (17,18, 36, 186). Los IFNs tipo I se conoce que son efectivos contra los sistemas de replicación del VHC y se ha documentado que varias proteínas inducidas por los IFNs tienen actividad anti-VHC. Sus efectos antivirales son mediados por varias proteínas efectoras, incluyendo la protein cinasa activada por RNA de doble cadena, trifosfatasa de guanosina MxA, 2'-5'OAS, la deaminasa adenosin 1 específica de ARN (ADAR-1), p56 y RNasa L. Los IFN α/β aumentan los niveles basales de PKR, ADAR-1 y 2'-5'OAS, estas enzimas necesitan ser activadas por dsARN. La PKR fosforila la subunidad alfa del factor 2 de iniciación de la traducción eucariótica (eIF-2a), como consecuencia se bloquea la traducción del ARNm viral y celular (18, 187), y por consiguiente se inhibe la síntesis de proteínas. Los IFNs además aumentan la expresión de moléculas clase I y II del MHC las cuales conducen a un aumento en la expresión de antígenos y estimulación de la inmunidad adaptativa. En ratones transgénicos utilizados como modelo experimental de hepatitis B se ha encontrado que el TNF- α e IFN- γ , pueden bloquear la replicación del VHB por un mecanismo no citopático. Se han encontrado hallazgos de gran relevancia en la acción del IFN- α sobre el VHC: El IFN- α directamente inhibe la replicación del VHC a través de una vía independiente de MxA, sin embargo en muchos pacientes el IFN- α no es efectivo, por lo tanto el VHC ha desarrollado estrategias para resistir el efecto antiviral del IFN. Además la expresión de proteínas del VHC inhiben la señalización inducida por IFN- α desde el receptor de superficie celular hasta el núcleo a través de

la vía Jak-STAT. La inhibición ocurre río abajo después de la fosforilación de la tirosina de STAT y resulta en un aumento no controlado de genes blanco de IFN- α . También, se ha reportado que la glicoproteína E2 de la envoltura del VHC y la proteína no estructural NS5A interactúan e inhiben las PKR (Figura 5c y d). Este y otros mecanismos pueden contribuir a la resistencia del virus a la terapia con IFN- α observada en muchos pacientes y puede representar una estrategia de escape general de VHC que contribuyen a la persistencia antiviral y patogenia de la enfermedad hepática crónica.

Un mejor conocimiento de las interacciones entre VHC y el sistema IFN pueden resultar en terapias más efectivas contra este virus que es el causante de la hepatitis crónica, cirrosis y hepatocarcinoma celular a nivel mundial (17-19, 36, 179).

c) PENTOXIFILINA

La pentoxifilina (PTX), es un inhibidor de fosfodiesterasas no específico con propiedades anti-inflamatorias y antifibrogénicas (188), que ha demostrado ser útil en diferentes modelos, tanto *in vitro* como *in vivo* de diversas enfermedades hepáticas como: la esteatohepatitis no alcohólica (189-191) inflamación (192-195), fibrosis/cirrosis (196-199), enfermedad hepática alcohólica (200-202) y además de otras patologías como endotoxemia (203) y sepsis (204). Los efectos benéficos de la PTX ocurren a través de mecanismos tales como la reducción de los niveles de NF- κ B (204), inhibición de fosfodiesterasas, incremento de los niveles de AMPc, y disminución de citocinas: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), IFN- γ (205-212), e

inhibición de la activación de las células estelares hepáticas y de la expresión de ARNm de procolágena I (213). Además inhibe otros mecanismos básicos de fibrogénesis tales como proliferación celular y síntesis de matriz extracelular (MEC) (210, 214, 215).

JUSTIFICACIÓN

La infección por VHC afecta a más de 170 millones de personas a nivel mundial, por lo que representa una de las principales pandemias virales en la actualidad. En México, aproximadamente 1.4% de la población general está infectada por este virus. La hepatitis C es una enfermedad que involucra procesos inflamatorios desencadenados por la entrada del VHC a la célula huésped lo que conduce a la producción de fibrosis. El avance en el conocimiento de la inmunopatogénesis de la enfermedad podrá permitir en un futuro el diseño de nuevas medidas terapéuticas. Además, la terapia actual es inefectiva en un 40-50% de los pacientes con hepatitis C crónica, por lo que decidimos conocer el efecto de otros fármacos con funciones conocidas como antifibróticos (Colchicina), antivirales-inmunomoduladores (IFN- α), y antiinflamatorios (Pentoxifilina) en la cascada inflamatoria que sucede en la hepatitis C.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el efecto de la Colchicina, Interferón- α 2b y Pentoxifilina sobre la expresión y secreción de mediadores celulares involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune que acontece en pacientes con hepatitis C crónica.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Realizar pruebas bioquímicas como: biometría hemática (BH), pruebas de funcionamiento hepático (PFH); (AST, ALT, ALP, BT, BD, GGT, Albúmina, PT), α -feto-proteína, anticuerpos antimitocondriales, antimúsculo liso, antinucleares, anticitoplásmicos y antitiroideos y marcadores serológicos para el virus de la hepatitis B (HbsAg, HbcAb) y C (HCVAb, ELISA de 2ª generación) a los pacientes que participaron en el estudio, antes y durante el tratamiento con COL, IFN- α , o PTX. Análisis histopatológico en las biopsias de los pacientes tomadas a los 0, 2 y 12 meses de tratamiento
2. Determinar el efecto de la COL, IFN- α o PTX sobre el ARN del VHC en todos los pacientes que participaron en el estudio al inicio y a los 2 meses de tratamiento.
3. Evaluar el efecto de la COL, IFN- α o PTX en la expresión y secreción de citocinas pro-inflamatorias: IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ , y la quimiocina CXCL-8/IL-8 en CMNs de pacientes con infección crónica por el VHC, antes y durante el tratamiento (0, 2 y 12 meses).
4. Evaluar el efecto de la COL, IFN- α o PTX en la expresión de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y CXCL-8/IL-8 en tejido hepático de pacientes con hepatitis C crónica, a los 0, 2 y 12 meses de tratamiento.

HIPOTESIS NULA

No existe diferencia en el efecto de la COL, IFN- α o PTX sobre los parámetros bioquímicos, carga viral del VHC y el análisis histopatológico de los pacientes con hepatitis C crónica durante el tratamiento.

No existe diferencia en el efecto de la COL, IFN- α o PTX sobre la expresión y secreción de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y CXCL-8/IL-8 en CMNs y en la expresión en tejido hepático de pacientes con infección crónica por VHC.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La hepatitis C tiene un componente inflamatorio que favorece la persistencia del VHC y el desarrollo de la enfermedad crónica

MATERIAL Y METODOS

1. Selección de pacientes

Se incluyeron 26 pacientes de ambos sexos y edades comprendidas entre los 21 y 63 años con infección por el VHC que aceptaron participar en el estudio de manera voluntaria y firmaron una carta de consentimiento. Se incluyeron pacientes vírgenes a tratamiento antiviral, 15 con antecedentes de transfusión sanguínea previa y anticuerpos positivos contra el virus de hepatitis C, que presentaban alteración de las PFHs y evidencia en la biopsia de cualquier lesión histológica y 11 pacientes con antecedentes de transfusión sanguínea previa, anticuerpos positivos contra el VHC, y diagnóstico de cirrosis postnecrótica en estadio A de Child.

Criterios de exclusión

Antecedentes de alcoholismo crónico con consumo > 30 g de etanol al día.

Seropositividad para HBsAg, HBcAg o HBcAb.

Evidencia de hepatopatía de otra etiología (basada en historia clínica, histopatológica y marcadores inmunológicos).

Antecedentes de transfusión en las 8 semanas previas.

Tratamiento antifibrogénico, antiviral o inmunomodulador previo.

Tratamiento en los 4 meses previos con agentes anti-inflamatorios esteroideos y no esteroideos.

Antecedente previo de sangrado por complicaciones de hipertensión portal.

Antecedente de cirugía derivativa para tratamiento de hipertensión portal.

Creatinina > 2mg/dl 42

Presencia de enfermedad tumoral maligna a cualquier nivel.

Proceso infeccioso o inflamatorio a otro nivel.

Falta de consentimiento escrito.

De forma aleatoria recibieron COL (1 mg diario, 5 días a la semana) 8 pacientes, IFN- α (3 MU, 3 veces por semana, por vía subcutánea) 7 pacientes o PTX (800mg diarios) 11 pacientes. Cada tratamiento fue administrado durante 12 meses.

A todos los pacientes al inicio del tratamiento se les realizó historia clínica detallada, examen físico completo, marcadores serológicos para los virus de la hepatitis B (HbsAg, HbcAb) y C (HCVAb, ELISA de 2ª generación) y determinaciones como: BH, PFH (AST, ALT, ALP, BT, BD, GGT, Albúmina, PT), α -feto proteína, anticuerpos anti-mitocondriales, antimúsculo liso, antinucleares, anticitoplásmicos y antitiroideos, en todos se realizó ultrasonido hepático. En condiciones basales, a los 2 y 12 meses (m) se les tomó 30 ml de sangre periférica; 25 ml para separación y cultivo de células mononucleares (CMNs), y 5 ml para la cuantificación de ARN-VHC y pruebas bioquímicas.

Para cuantificar el ARN viral se utilizó el kit de COBAS Amplicor (Roche Diagnostics, Alemania), los plasmas fueron descongelados y después se siguieron las indicaciones del fabricante. Solo se utilizaron muestras de los tiempos 0 y 2 meses para valorar la respuesta temprana de los fármacos sobre la replicación viral.

2. Biopsia hepática: histología y extracción de ARN

Se realizó una biopsia hepática percutánea con aguja de Tru Cut en todos los pacientes a los 0, 2 y 12 meses de tratamiento, el tejido se dividió en 2 fragmentos; uno para conocer la expresión tisular (ARNm) de las citocinas la cual de inmediato fue

congelado en nitrógeno líquido bajo condiciones estériles y se almacenó a -70°C , para después realizar la extracción de ARN total por el método de Chomcszinky (216) y otro fragmento para la valoración histológica que se llevó al Departamento de Patología del INCMNSZ para el análisis cualitativo de fibrosis.

3. Obtención de células mononucleares.

En las muestras de sangre periférica a los 0, 2 y 12 meses las CMNs se obtuvieron por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostics, USA), como se describe a continuación: la muestra sanguínea se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min., después de transcurrido el tiempo, se tomó la capa de leucocitos, se adicionó buffer de fosfatos (PBS) y se mezcló muy bien. Previamente en un tubo de polipropileno de 15 mililitros (ml) se adicionaron 3.5 ml de Ficoll-Hypaque y suavemente se agregaron 7 ml de la suspensión celular, la muestra se centrifugó a 2000 rpm durante 20 min. Después de ese tiempo, se separó el anillo de CMNs, las células se lavaron con PBS (2 o 3 veces) posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm con la finalidad de eliminar plaquetas. El botón se resuspendió en medio RPMI-1640 conteniendo 10% de suero bovino fetal (decomplementado) y antibiótico (penicilina-estreptomicina al 1%). El número de células se cuantificó en cámara de Neubauer.

Se cultivó 1×10^6 de CMNs en medio RPMI-1640 a 37°C , con 5% de CO_2 durante 24 hr. Después de transcurrido el tiempo se centrifugó la muestra a 2000 rpm durante 5 min., se separó el sobrenadante y el botón celular. En el sobrenadante celular se cuantificó la secreción de citocinas por ensayos inmunoenzimáticos (ELISAs) específicos para cada una de las citocinas. La expresión de las citocinas se realizó en

el botón celular que previamente había sido homogenizado con solución desnaturizante y almacenado a -70°C hasta el momento de realizar la extracción de ARN total. Después de haber obtenido el ARN total, se cuantificó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV) para determinar la concentración de ARN y de las proteínas en la muestra. Con 500 nanogramos (ng) de ARN se realizó RT-PCR para cuantificar la expresión de ARNm de las citocinas estudiadas. Estas fueron IL- 1β , TNF- α , CXCL-8/IL-8 e IFN- α y como gen endógeno se utilizó $\beta 2$ -macroglobulina.

4. Extracción de ARN total de CMNs y biopsias hepáticas

Para la extracción de ARN total se utilizó la técnica modificada de Chomczynski (216). Al tubo que contenía el botón de CMNs se le adicionó 1 ml de solución desnaturizante conteniendo 10 microlitros (μl) de β -mercaptoetanol, se homogenizó en un vortex y se dividieron en 2 tubos de 1.5 ml, en el caso de la biopsia hepática congelada el tejido se disgregó con un homogenizador de tejidos hasta que se obtuvo una solución homogénea, después se adicionó acetato de sodio 2 molar (M) pH 4.8 y se mezcló por inversión, lo siguiente fue adicionar fenol saturado caliente (50°C) se agitó suavemente, se adicionó cloroformo alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y después se incubó durante 10 min. a 4°C , transcurrido el tiempo se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min. a 4°C , concluido el tiempo se tomó la fase acuosa (parte superior) y se transfirió a otro tubo de 1.5 ml previamente enfriado, se adicionó cloruro de sodio (NaCl) 4M y etanol absoluto frío. Se dejó precipitar durante 24 horas (h) a -70°C . Después de transcurrido el tiempo, la muestra se centrifugó durante 30 min. a 14,000 rpm a 4°C , se eliminó el sobrenadante y el botón se lavó

con etanol al 75%, se centrifugó durante 10 min. a 14,000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 50 µl de agua/DEPC. Finalmente se almacenó el ARN total a -70° C, para evitar su degradación.

5. Cuantificación de Ácidos Nucleicos

Se tomaron 2 µl de ARN total, se adicionaron 498 µl de agua/dietil pirocarbonato (DEPC, dilución 1:250). Para leer la absorbancia (Abs) a las longitudes de onda de 260 y 280 nanómetros (nm) se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU450, para conocer la concentración se aplicó la siguiente formula:

$$\text{Abs } 260 \text{ nm} \times \text{dilución} \times \text{factor} = \text{Abs} \times 250 \times 0.04 \text{ microgramos } (\mu\text{g}) = [\mu\text{g}/\mu\text{l}].$$

La densidad óptica a 280 nm nos indica la cantidad de proteínas que se encuentran en la muestra. El cociente entre 260 nm/280 nm debe ser entre 1.6-2.0, si es mayor deben de realizarse lavados con cloroformo alcohol isoamilico para eliminar proteínas.

6. Expresión de Citocinas en CMNs y biopsia hepática.

A partir del ARN total, la expresión del ARNm de las citocinas en CMNs y en tejido hepático, se cuantificó en presencia de un control interno poliespecífico, el plásmido pQA-1, que fue donado amablemente por el Dr. Shire, Sanofi Elf Bio Recherches Labège, Francia (217) mediante RT-PCR, lo que permitió conocer el número de moléculas del ARNm que se expresaban ya sea en CMN como en tejido hepático en cada uno de los pacientes estudiados.

a) Control interno de ARN

La ribosonda que se empleó como control interno se sintetizó del plásmido pQA-1 (217, 218). En principio el plásmido pQA-1 fue linearizado con 10 unidades (U) de la endonucleasa de restricción EcoRI durante 1 hr. a 37°C. Posteriormente se verificó la ruptura del plásmido por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en solución 0.5 X de tris-borato-EDTA (TBE) y 0.05 µg/ml de bromuro de etidio. Una vez linearizado se construyó la ribosonda con 400 ng del plásmido mediante la acción de 50 U de la enzima T7 RNA polimerasa, en presencia de 2.5 miliMolar (mM) de cada uno de los NTP's y 40 U de inhibidor de la RNasa. Después se incubó 1 hr a 37° C, se agregó 32 U de DNasa I y el ARN se purificó con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico. Por último, el botón obtenido se precipitó con etanol absoluto. La pureza se verificó en un gel de agarosa al 1% con formaldehído y 0.05 µg/µl de bromuro de etidio. Además, la ribosonda o ARN estándar se cuantificó por espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm y se almacenó a -70° C, una vez purificada la ribosonda, se encontraron las condiciones óptimas para concentración de reactivos y temperatura de alineamiento necesarias para la RT-PCR de cada una de las citocinas estudiadas y posteriormente se determinó la expresión de cada una de ellas.

b) Construcción de la ribosonda

Lo primero que se hizo fue obtener células competentes por cloruro de calcio de la cepa DH5α de *E. coli*, lo siguiente fue la transformación de las células, adicionando .1µg de plásmido a las células competentes y posteriormente espatulando en las cajas con medio Luria-Bertani, se incubaron durante 24 hr /37°C. Para la purificación del plásmido se utilizó la técnica de lisis alcalina (glucosa-tris-EDTA), se cuantificó y se observó en un gel de agarosa al 1%. Se encontraron dos bandas de alto peso

molecular. Al observar el mapa de restricción del plásmido, este presentaba un sitio para la endonucleasa de restricción HindIII al inicio de la construcción y un sitio para EcoRI al final de la secuencia, por lo que se procedió a una doble digestión con ambas enzimas. Cuando se realizó la digestión con una sola enzima, el plásmido se linearizó, ya que se observó una banda de aproximadamente 3.3 Kb en un gel de agarosa al 1%. Se realizó una doble digestión con HindIII y EcoRI, al observar la electroforesis de esta digestión, la banda de aproximadamente 3.3 kilobases (Kb) se cortó en 2 fragmentos: uno de aproximadamente 2.5 Kb y otro cercano a 0.7 Kb.

La banda de 0.7 Kb es la secuencia de interés, pues es el tamaño de la construcción sintética que contiene la secuencia de nucleótidos de varias citocinas y factores de crecimiento. Posteriormente, se realizó una electroforesis horizontal en agarosa al 1% que corrió durante 1 h/100 volts, se cortó la banda y se maceró la agarosa hasta casi disolverla totalmente y finalmente se purificó por fenol-cloroformo y se precipitó con etanol absoluto.

Para construir la ribosonda, se tomaron 5 μ l del ADN obtenido después de la purificación de la banda, y se realizó el mismo procedimiento que se utilizó para obtener el control interno poliespecífico. Para corroborar que el producto obtenido contenía toda la secuencia de la construcción sintética se realizó la RT-PCR con oligonucleótidos para una proteína constitutiva (β 2-microglobulina) y para TNF- α donde se observa una banda para ambos de aproximadamente 370 pares de bases (pb) que es el tamaño esperado del producto de la PCR.

Con el ARN estándar (ribosonda) se encontraron las condiciones óptimas de RT-PCR para β 2-microglobulina, IL-6, TNF- α , CXCL-8 e IFN- γ . Después se realizó una curva

de concentración del plásmido desde 1.8 ng/ μ l – 2.75 picogramos (pg)/ μ l para β 2-microglobulina. Una vez que se obtuvo la curva, se hizo RT-PCR competitiva, es decir, en un mismo tubo se mezcló ARN de la biopsia y ARN del control poliespecífico a diferentes concentraciones, manteniendo constante la cantidad de ARN de la biopsia. Para IL-1 β , TNF- α , CXCL-8 e IFN- γ , la curva de concentración del ARN estándar para cada una de las citocinas fue desde 1.8 ng/ μ l hasta 7 fentogramos (fg)/ μ l. Además se realizó RT-PCR competitiva donde se mezclaron diferentes concentraciones de la ribosonda con la misma concentración del ARN de la muestra, y así obtener un cociente de 0.9-1 que nos indica que ambos ARNs se encuentran a la misma concentración. La figura 7 es ejemplo de una curva estándar para TNF- α .

c) Transcripción Reversa

La RT se llevo a cabo con mezclas del ARN de la muestra del paciente (biopsia o CMNs) y el ARN del plásmido pQA-1 (estándar), se mezclaron 10 ng de ARN de la muestra con 1 fg del ARN estándar. Las mezclas de ARN total fueron desnaturalizadas durante 5 min. a 70°C y se enfrian rápido en hielo. Posteriormente, se agregaron 100 ng del oligonucleótido iniciador (Oligo dT₁₆), 50 U de la enzima RT obtenida del virus de leucemia murina Moloney (Applied Biosystems) y 0.5 mM de cada uno de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 μ l. Se incubó la reacción durante una hora a 42° C seguida de 5 min a 95° C en un termociclador (Perkin-Elmer 9600). Como parámetro de comparación inter e intraensayo se utilizó el plásmido pQA-1 para la cuantificación del gen que codifica para la proteína estructural β 2-microglobulina.

d) Reacción en cadena de la polimerasa

El ADN complementario (cADN 4 μ l) se mezcló con 10 mM de cada uno de los iniciadores sentido y antisentido para las distintas citocinas, 0.5 mM de cada uno de los dNTPs y 2 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo a 94°C por 5 min., seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min., 57°C por 1 min. y 72°C por 1 min., finalmente 1 ciclo a 72°C por 10 min., todo esto en un termociclador programado. Los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 2% con 0.05 μ g/ml de bromuro de etidio y se tomó una fotografía sobre un transiluminador de luz UV con película Polaroid, las imágenes se analizaron en equipo EDAS-Kodak.

7. Secreción de citocinas por CMNs.

La secreción de citocinas se cuantificó con estuches inmunoenzimáticos (ELISA, R&D Systems) para cada una de las citocinas estudiadas. Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron descongelados y posteriormente se siguieron las instrucciones del fabricante. La sensibilidad fue de: 1 pg/ml para IL-1 β , 10 pg/ml para CXCL-8/IL-8, 4.4 pg/ml para TNF- α y 3 pg/ml para IFN- γ .

8. Análisis estadístico.

Los datos se muestran en medias/medianas (rango: mínimo y máximo) y se analizaron mediante pruebas no paramétricas: la prueba de ANOVA, Kruskal-Wallis, prueba de Wilcoxon y la correlación de Spearman. Se consideró significativa una $p < 0.05$, a través del programa SSPS versión 12.

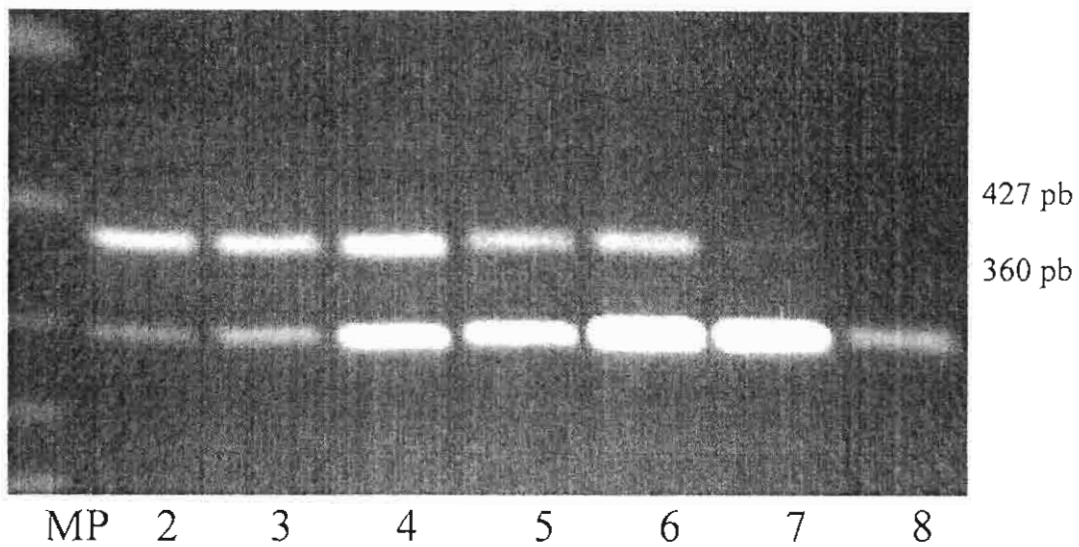


Figura 7. Procedimiento de cuantificación para TNF- α . Un ejemplo de la amplificación del cDNA del ARN de tejido hepático y del ARN estándar del plásmido pQA para TNF- α . Los productos amplificados fueron corridos en una electroforesis en un gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. El gel fue fotografiado con un sistema EDAS (Kodak). La figura muestra una banda de 360 pb que representa los amplicones obtenidos con el cADN estándar y un producto de 427 pb del cADN del hígado. Todas las líneas contienen 1 ng de ARN total de la biopsia hepática con 0.0075 pg, 0.01 pg, 0.02 pg, 0.03 pg, 0.04 pg y 0.05 pg de ARN estándar en las líneas 2 a 7, respectivamente, en la línea 8, 0.01 pg de ARN estándar. De cada par de bandas la intensidad relativa del amplicon del hígado/ amplicon estándar se calcula. La tasa entre el amplicon del tejido/amplicon de la ribosonda fue 0.45, 0.72, 1.1, 1.66, 2.5, líneas 2 a 6. En la línea 4, la tasa entre el amplicon problema/amplicon estándar permitió la comparación de una concentración conocida del ARN estándar con una cantidad desconocida del ARNm de TNF- α . Cada cuantificación fue hecha con al menos 3 concentraciones del plásmido. El número de moléculas de ARNm del ARN total fue calculado con el peso molecular del plásmido y el número de Avogrado.

RESULTADOS

Se incluyeron pacientes con edades comprendidas entre los 21 y 63 años. En cuanto el número de mujeres y hombres que integraron los grupos fue de la siguiente forma: COL=7 mujeres y un hombre; IFN- α = 5 mujeres y 2 hombres y en el caso de PTX= 9 mujeres y 2 hombres.

1. Citocinas en células mononucleares y tejido hepático

Los resultados de expresión y secreción de citocinas en CMNs y la expresión del ARNm en tejido hepático después de recibir tratamiento fueron los siguientes:

a. Colchicina

La COL disminuyó alrededor de 10 veces la expresión (moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de β 2-microglobulina) de TNF- α en CMNs a los 12 m: 421 vs. 4.5 ($p < 0.050$) y una tendencia a disminuir en el trayecto de los 2 m a los 12 m de tratamiento: 415 vs. 4.5 ($p = 0.075$). La expresión de IFN- γ fue disminuida durante el tratamiento con COL, a los 2 m fue: 191 vs. 189, y alcanzó significancia a los 12 m ya que fueron valores no detectables de la expresión del ARNm (191 vs. 0.4) ($p = 0.018$) y en el trayecto de los 2 m (189) a los 12 m (0.8) ($p = 0.028$) se observó este mismo efecto, **figura 8, tabla 1**.

La COL ocasionó una disminución a los 12 meses de tratamiento, en la secreción (pg/ml) de IL-1 β : 458 vs. 269 ($p < 0.05$), TNF- α : 970 vs. 550 ($p < 0.05$) e IFN- γ : 177 vs. 15 ($p = 0.012$) y mientras que, al comparar que sucedía de los 2 m a los 12 m, se encontró que hubo una disminución en la secreción de TNF- α 875 vs. 550 ($p < 0.05$) y una tendencia a disminuir IFN- γ 121 vs. 15 ($p = 0.079$), **figura. 9**, no tuvo efecto sobre CXCL8/IL-8 **tabla 1**.

Tabla 1. Expresión y secreción en CMN de IL-1 β , TNF- α , CXCL-8 e IFN- γ en el grupo de pacientes que recibieron COLCHICINA, a los 0, 2 y 12 meses de tratamiento.

Citocina	Expresión			Secreción		
	0 mes	2 meses	12 meses	0 mes	2 meses	12 meses
IL-1 β	305/2.8 (2.5-1630)	210/2.5 (0.4-1630)	106/1.6 (0.4-750)	458/492 (234-550)	405/510 (112-555)	269/326* (0-548)
TNF- α	421/13 (0.7-1650)	425/13 (0.4-1650)	4.5/1.2* (0.4-2.3)	970/984 (901-996)	875/964 (497-1009)	550/675* (0-986)
CXCL-8/ IL-8	50/3.7 (1.5-375)	28/3.7 (0.6-188)	49/2.8 (1.5-375)	3126/3159 (2966-3281)	3195/3167 (3084-3318)	2396/3119 (0-3351)
IFN- γ	191/3.6 (0.4-1500)	189/2.0 (0.4-1500)	0.7/0.4* (0.4-2.9)	177/109 (4-405)	121/116 (2-263)	15/5.5* (0-58)

Los valores se expresan como medias/medianas (mínimo-máximo). N = 8

Expresión se expresa en moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de $\beta 2$ -microglobulina. La secreción se expresa en pg/ml. * $p < 0.05$, # $p = 0.08$.

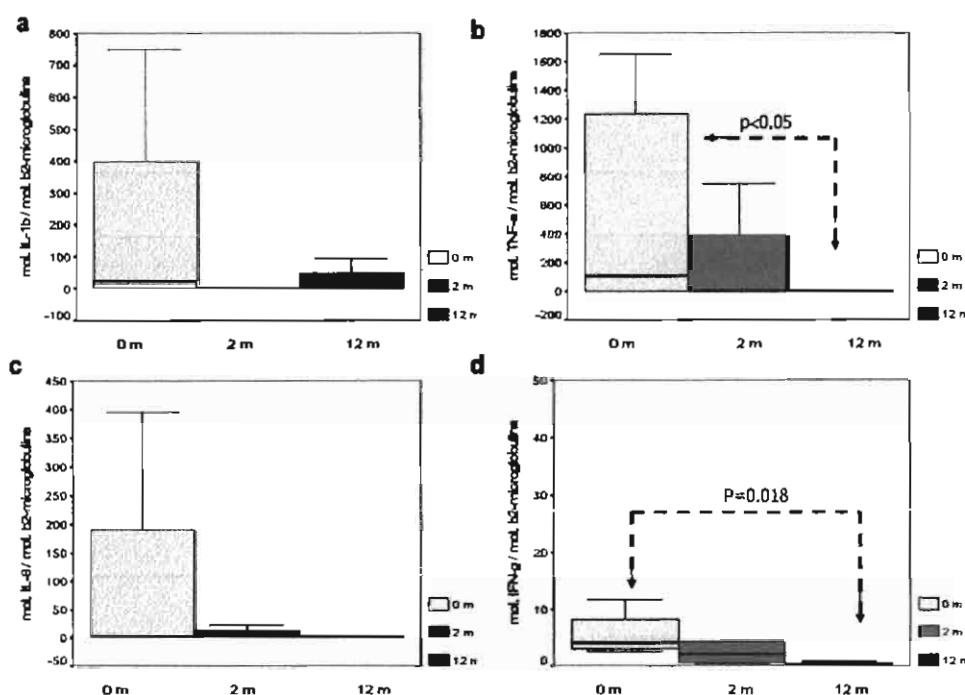


Figura 8. Expresión de citocinas en CMNs de pacientes con HCC (N=8) que recibieron COL durante 12 meses. Las mediciones se realizaron al inicio, 2 y 12 meses tratamiento. A) IL-1 β , b) TNF- α , c) CXCL-8/IL-8 e d) IFN- γ . La expresión de citocinas se expresa en moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de $\beta 2$ -microglobulina.

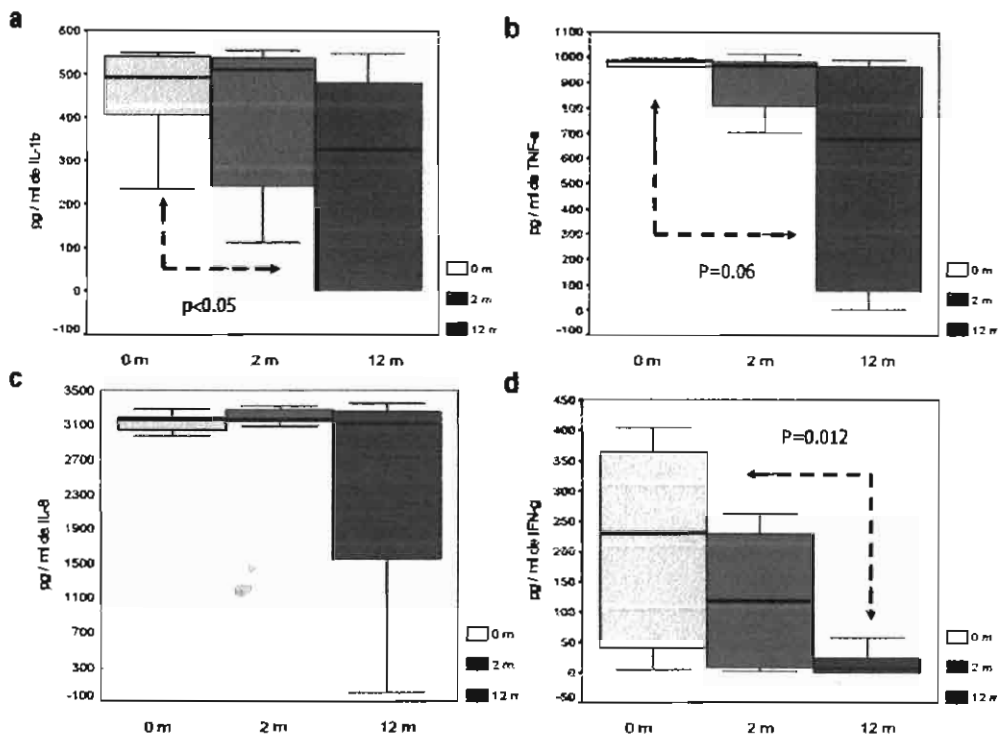


Figura 9. Secreción de citocinas por CMNs de pacientes con HCC que recibieron COL durante 12 meses. Las mediciones se realizaron a inicio, 2 y 12 meses tratamiento. A) IL-1 β , b) TNF- α , c) CXCL-8/IL-8 y d) IFN- γ . La secreción de las citocinas se expresa en pg/ml de citocina.

En el tejido hepático, hubo una tendencia a disminuir la expresión (moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de $\beta 2$ -microglobulina) del ARNm de IL-1 β a partir de los 2 meses y esa tendencia se mantuvo hasta los 12 meses, basal: 994 vs. 2m: 348 ($p = 0.06$) o vs. 12 m: 177 ($p=0.06$). Además ocasionó el aumento de la expresión de IL-8 después de 2 meses de tratamiento: 179 vs. 501 ($p<0.05$), **figura 10, tabla 2**.

A los 12 meses de tomar la COL, la expresión de TNF- α e IFN- γ fue mayor en tejido hepático que en CMN ($p = 0.028$), mientras que este mismo evento sucedió en la expresión de CXCL-8/IL-8 a partir de los 2m ($p = 0.018$) y continuó hasta los 12 meses ($p < 0.05$). Al comparar la secreción de las diferentes citocinas estudiadas encontramos que desde el inicio y durante todo el tratamiento la secreción de CXCL-8/IL-8 fue mayor que la secreción de las otras 3 citocinas: TNF- α , IL-1 β e IFN- γ ($p = 0.02$). TNF- α tuvo valores más altos que IL-1 β e IFN- γ al inicio y durante el

tratamiento ($p= 0.03$). La observación es que en estos pacientes existe actividad inflamatoria que involucra la producción principalmente de TNF- α y CXCL-8/IL-8 durante la infección viral.

Tabla 2. Expresión de IL1 β , TNF- α , CXCL-8 e IFN- γ en tejido hepático del grupo de pacientes que recibieron COL, a los 0, 2 y 12 meses de tratamiento.

Citocina	COL		
	0 m	2 m	12 m
IL-1 β	994/587 (10-3327)	348/243 (51-968)	177/83 (0-521)
TNF- α	392/454 (59-808)	262/266 (116-477)	173/120 (4-460)
CXCL-8/ IL-8	179/96 (44-466)	501/427* (133-1083)	210/199 (20-410)
IFN- γ	59/43 (4-150)	68/34 (4-210)	59/12 (0.4-222)

Los valores se expresan como medias/medianas (mínimo-máximo). N=8
Expresión se expresa en moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de $\beta 2$ -microglobulina.
* $p=0.06$, * $p< 0.05$.

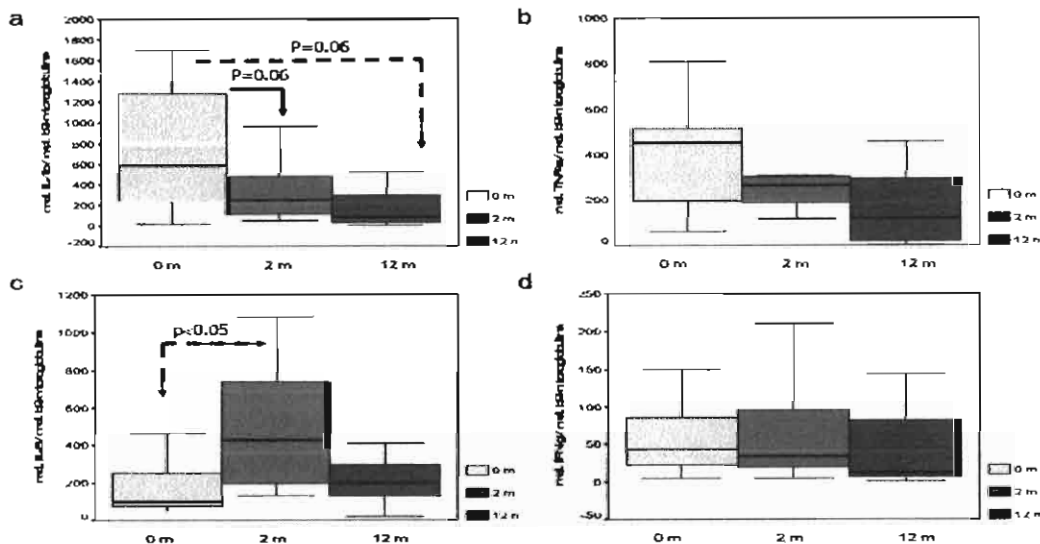


Figura 10. Expresión de ARNm de citocinas en tejido hepático de pacientes con HCC ($n=8$) que recibieron COL. Las mediciones se realizaron al inicio, 2 y 12 meses tratamiento. A) IL-1 β , b) TNF- α , c) CXCL-8/IL-8 y d) IFN- γ . La secreción de las citocinas se expresa en pg/ml.

b. Interferón- α 2b

En las CMN de los 7 pacientes que recibieron IFN- α , el medicamento disminuyó la expresión (moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de β 2-microglobulina) de IL-1 β a valores no detectables después de 12 meses de tratamiento: 272 vs. 1.7 ($p=0.04$). IFN- α no modificó de manera significativa la expresión de TNF- α , CXCL-8/IL-8 e IFN- γ , **tabla 3** y **figura 11**.

En cuanto a la secreción (pg/ml), el IFN- α tuvo efecto sobre las 3 citocinas: se observó una tendencia a disminuir IL-1 β a los 2 meses de administrar el fármaco: 467 vs. 302 ($p=0.09$) y fue significativa a los 12 meses: 407 vs. 16 ($p=0.018$), en el trayecto de los 2 a los 12 meses disminuyó significativamente 302 vs. 16 ($p=0.028$), esto demuestra que la disminución de IL-1 β fue gradual. En la secreción de TNF- α , al comparar el efecto antes de iniciar y después de 12 meses, indujo disminución; 882 vs. 286 ($p=0.048$), y también durante el transcurso de los 2 a los 12 meses; 899 vs. 286 ($p=0.028$), a los 2 meses no ocasionó cambios en la secreción. No tuvo efecto sobre la secreción CXCL-8. La acción sobre IFN- γ fue inducir la disminución a los 2 m de tratamiento: 231 vs. 17 ($p=0.028$) y se mantuvo así a los 12 m: 231 vs. 13 pg/ml ($p<0.05$), estos resultados se compararon con los niveles basales de IFN- γ , **figura 12**. Encontramos que el IFN- α en CMN tuvo efecto sobre la expresión y secreción de IL-1 β a los 12 m de tratamiento, y además disminuyó la secreción de TNF- α e IFN- γ a partir de los 2 m, **tabla 3**.

Tabla 3. Expresión y secreción en CMNs de IL-1 β , TNF- α , CXCL-8 e IFN- γ en el grupo de pacientes que recibieron Interferón- α , a los 0, 2 y 12 meses de tratamiento.

Citocina	Expresión			Secreción		
	0 mes	2 meses	12 meses	0 mes	2 meses	12 meses
IL-1 β	272/4.4 (1.5-765)	688/750 (0.4-2500)	1.7/0.4* (0.4-5.9)	466/540 (70-593)	302/411# (62-544)	16/0* (0-88)
TNF- α	3.4/3.6 (0.4-4.2)	1.7/0.4 (0.4-4.8)	3.0/1.5 (0.4-11.7)	882/967 (396-1009)	899/919 (682-1036)	287/76* (0-1026)
CXCL-8/ IL-8	4.4/3.7 (1.5-11.7)	30/2.7 (0.4-187)	8.6/2.5 (0.4-47)	3138/3200 (2607-3342)	3139/3188 (2607-3453)	3135/1913 (10-3371)
IFN- γ	1.4/0.4 (0.4-4.2)	1.4/0.4 (0.4-4.2)	27/0.7 (0.4-184)	231/73 (0-738)	17/5* (0-56)	16/5* (0-72)

Los valores se expresan como medias/medianas (mínimo-máximo). n=7

Expresión se expresa en moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de β 2-microglobulina. La secreción se expresa en pg/ml

$p=0.09$, * $p<0.05$.

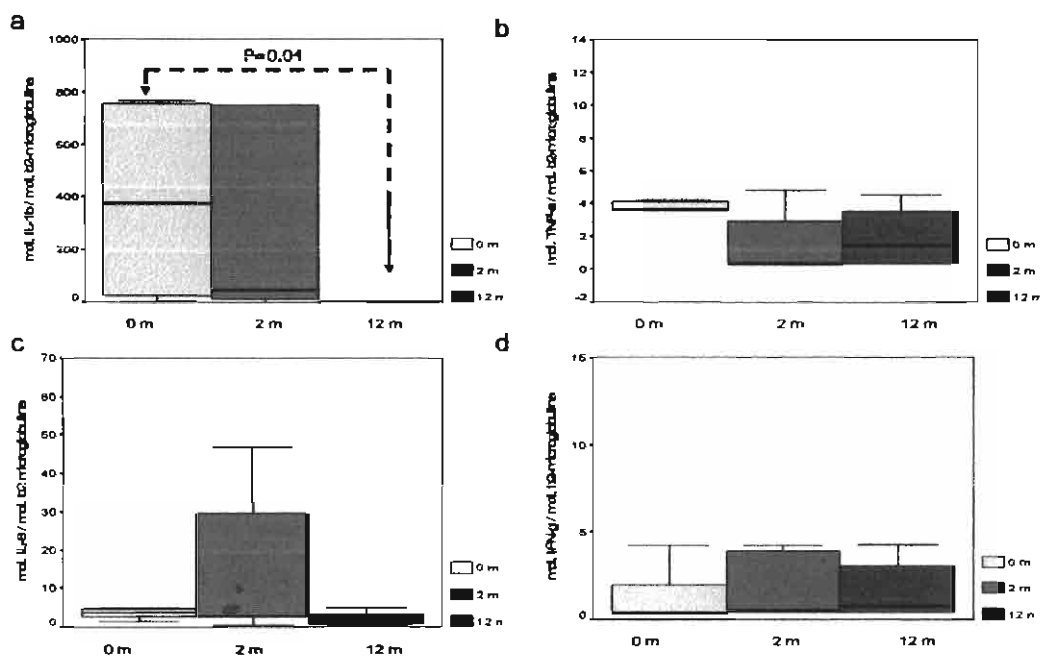


Figura 11. Expresión de citocinas en CMNs de pacientes que recibieron IFN- α (n=7) durante 12 meses; a) IL-1 β , b) TNF- α , c) CXCL-8/IL-8 y d) IFN- γ . La expresión se expresa en moléculas de citocina/10⁵ moléculas de β 2-microglobulina.

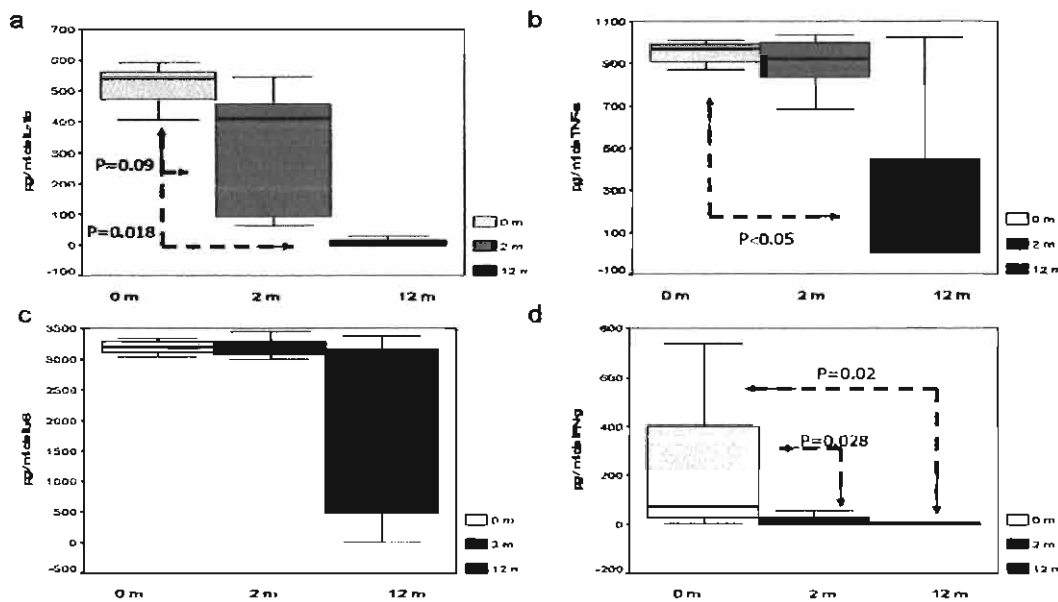


Figura 12. Secreción de Citocinas en CMNs de pacientes con HCC (n=7) tratados con IFN- α durante 12 meses; a) IL-1 β , b) TNF- α , c) CXCL-8/IL-8 y d) IFN- γ . La secreción se expresa en pg/ml de citocina.

Además en el tejido hepático provocó la disminución del ARNm (moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de $\beta 2$ -microglobulina) de TNF- α a partir de los 2 meses: 587 vs. 266 $p < 0.05$ (figura 13) y así continuó hasta los 12 meses; 587 vs. 206 $p < 0.05$, tabla 4.

Tabla 4. Expresión de citocinas en tejido hepático de pacientes con hepatitis C crónica antes y durante la administración de IFN- α .

Citocina	IFN- α 2b		
	0 m	2 m	12 m
IL-1 β	539/316 (101-1246)	482/360 (0-1124)	420/155 (46-1207)
TNF- α	587/438 (138/2218)	265/38* (4-1280)	206/48.5* (0.4-709)
CXCL-8/ IL-8	602/504 (166-1200)	646/731 (50-1150)	525/532 (4-1072)
IFN- γ	208/99 (4-450)	155/72 (1.5-432)	107/72 (5-399)

Los valores se expresan como medias/medianas (mínimo-máximo).

El ARNm se expresa en moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de $\beta 2$ -microglobulina.

* $p < 0.05$.

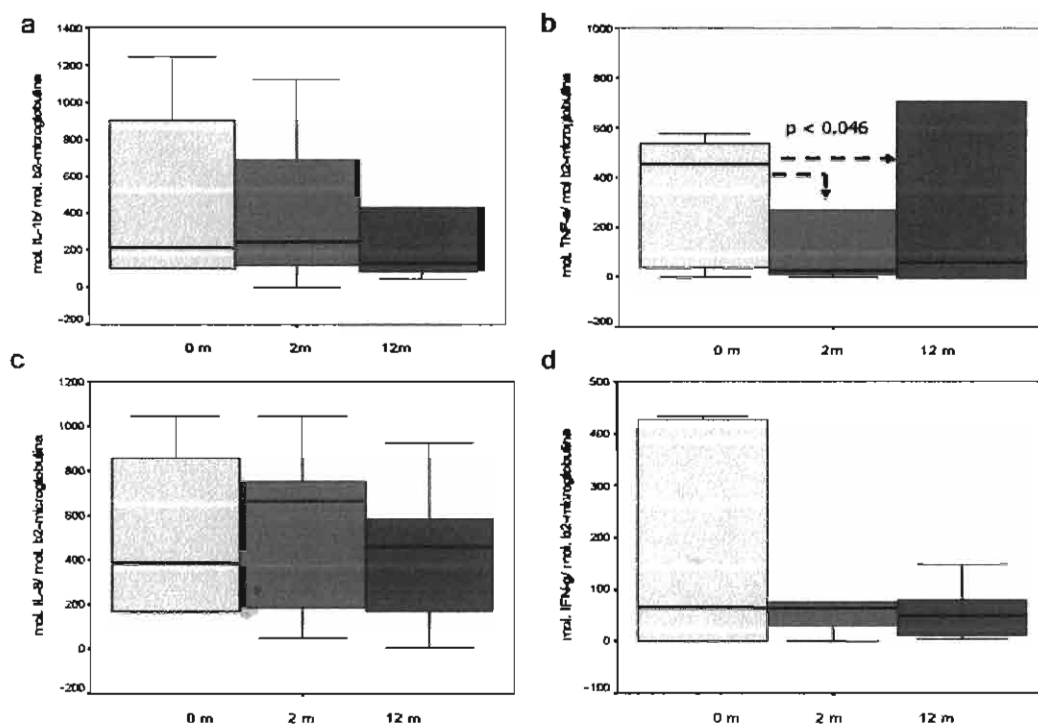


Figura 13. Expresión del ARNm de citocinas en biopsia hepática de pacientes que fueron tratados con IFN- α . La expresión se expresa en moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de β 2-microglobulina: a) IL-1 β , b) TNF- α , c) CXCL-8/IL-8 y d) IFN- γ

c. Pentoxifilina

En el grupo de 11 pacientes que recibió 800 mg/diarios de PTX, encontramos los siguientes efectos del fármaco sobre la expresión (moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de β 2-microglobulina) de citocinas en CMNs disminuyó la expresión de IL-1 β a partir de los 2 meses (453 vs. 206 $p < 0.05$) y continuo bajando hasta los 12 meses (453 vs. 73, $p < 0.05$); sobre TNF- α a los 2 meses ocasionó un ligero aumento del ARNm pero no fue significativo (405.5 vs. 534) y redujo significativamente a los 12 meses: 405 vs. 53, $p = 0.021$, la PTX produjo la disminución de la expresión a los 2 meses de CXCL-8 (75 vs. 2, $p = 0.003$), e IFN- γ (19.4 vs. 3.4, $p = 0.006$) **tabla 5, figura 14.**

Tabla 5. Expresión y secreción en CMNs de IL-1 β , TNF- α , CXCL-8 e IFN- γ en el grupo de pacientes que recibieron Pentoxifilina, a los 0, 2 y 12 meses de tratamiento.

Citocina	Expresión			Secreción		
	0 mes	2 meses	12 meses	0 mes	2 meses	12 meses
IL-1 β	452/15.8 (4.0-1900)	206/4.8* (0.4-1700)	73/1.5* (0.4-750)	1151/1196 (789-1406)	1017/1110 (0-1356)	147/0* (0-1148)
TNF- α	405/15.8 (11-1700)	534/46.9 (0.4-1700)	53/2.4* (0.4-375)	1073/1098 (657-1319)	890/1084# (0-1151)	503/500* (0-1049)
CXCL-8/ IL-8	75/4.8 (2.9-750)	2/2.5* (0.4-2.9)	45/2.5 (0.4-375)	3239/3268 (3089-3369)	2923/3187 (0-3369)	2038/3071* (0-3411)
IFN- γ	19/12.5 (0.4-96)	3.4/1.5* (0.4-12.5)	36/2.7 (0.4-375)	65/33 (0-160)	272/32* (0-1727)	13/2* (0-93)

Los valores se enuncian como medias/medianas (mínimo-máximo).

Expresión se expresa en moléculas de citocina/10⁵ moléculas de β 2-microglobulina. La secreción se expresa en pg/ml.

p=0.09, * p< 0.05.

Con la administración de la PTX, disminuyó la secreción en CMNs de IL-1 β a los 12 meses de tratamiento (1151 vs. 147, p=0.004) y durante el período de 2 a 12 meses (1017 vs. 147, p=0.007). Además indujo la disminución de TNF- α a los 12 meses (1073 vs. 503, p=0.004) y hubo una tendencia a disminuir a los 2 meses (1073 vs. 890, p=0.09), para estas dos citocinas se observa que la disminución fue gradual, es decir, hubo cambios a partir de los 2 meses y así continuó hasta terminar con el tratamiento. También disminuyó la secreción de CXCL8 (3239 vs. 2038, p=0.047) a los 12 meses de tomar el medicamento. Mientras que con IFN- γ fue diferente ya que a los 2 meses aumento (65 vs. 272 estadísticamente no significativa), y a los 12 meses disminuyó la secreción (65 vs. 13 p=0.017), el efecto inhibitorio de la PTX sobre la secreción de las citocinas estudiadas fue evidente a los 12 meses lo que implica que la acción sobre la proteína circulante fue a largo plazo, **figura 15, tabla**

5. Durante todo el período de estudio la secreción de CXCL8 fue mayor que la secreción de IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ ($p= 0.02$).

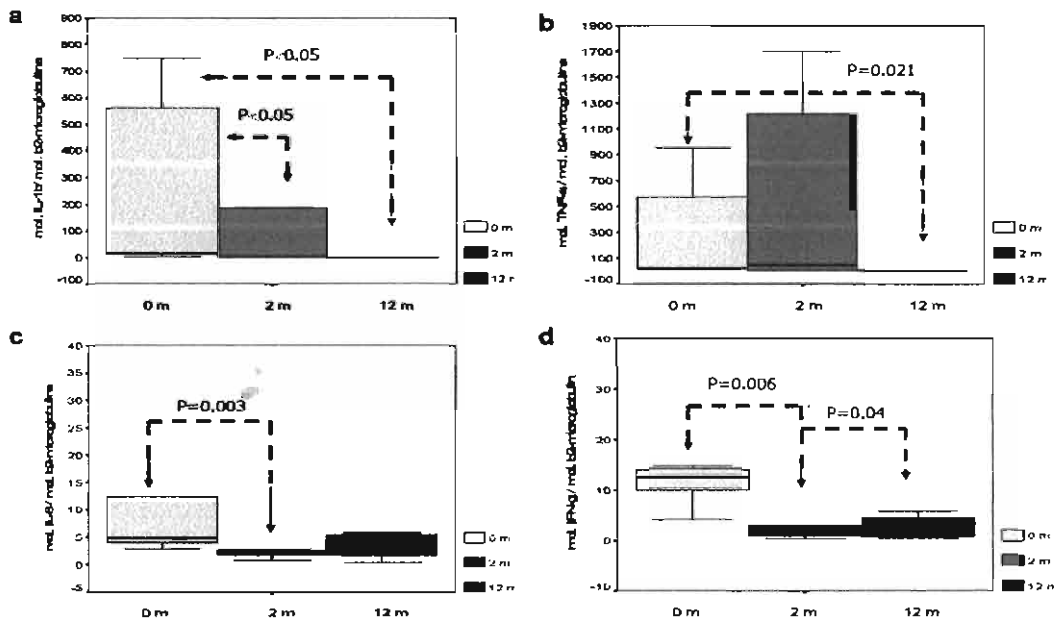


Figura 14. Expresión de citocinas en CMNs de pacientes con hepatitis C crónica que recibieron PTX durante 12 meses; a) IL-1 β , b) TNF- α , c) CXCL-8/IL-8 y d) IFN- γ . La expresión se expresa en moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de $\beta 2$ -microglobulina.

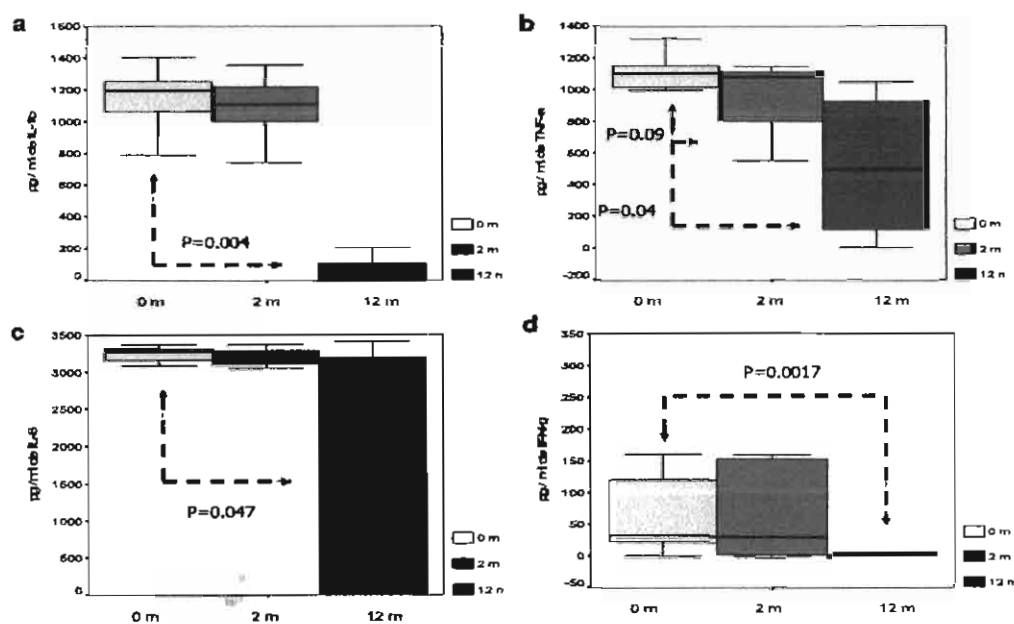


Figura 15. Secreción de citocinas por CMNs de pacientes con HCC que recibieron PTX durante 12 meses; a) IL-1 β , b) TNF- α , c) CXCL-8/IL-8 y d) IFN- γ . La secreción se expresa en pg/ml.

El efecto de la PTX sobre la expresión de citocinas (moléculas de citocina/ 10^5 moléculas de $\beta 2$ -microglobulina) en la biopsia hepática fue el siguiente: bajo los niveles de expresión de IL-1 β , a partir de los 2 meses (276 vs. 136, $p=0.004$) y continuó disminuyendo hasta los 12 meses tratamiento (276 vs. 70, $p=0.007$). Lo mismo sucedió con el ARNm de TNF- α , a los 2 meses disminuyó alrededor de 10 veces con respecto a la expresión basal: 776 vs. 76, $p=0.003$ y a los 12 meses disminuyó a valores casi no detectables: 776 vs. 13, $p=0.003$. La PTX no tuvo ningún efecto sobre la expresión de CXCL-8 e IFN- γ en tejido hepático, **figura 16, tabla 6**.

Al inicio y a los 2 meses del tratamiento, fue mayor la expresión del ARNm de CXCL-8 en la biopsia hepática que en las CMNs de los pacientes que recibieron PTX ($p=0.003$).

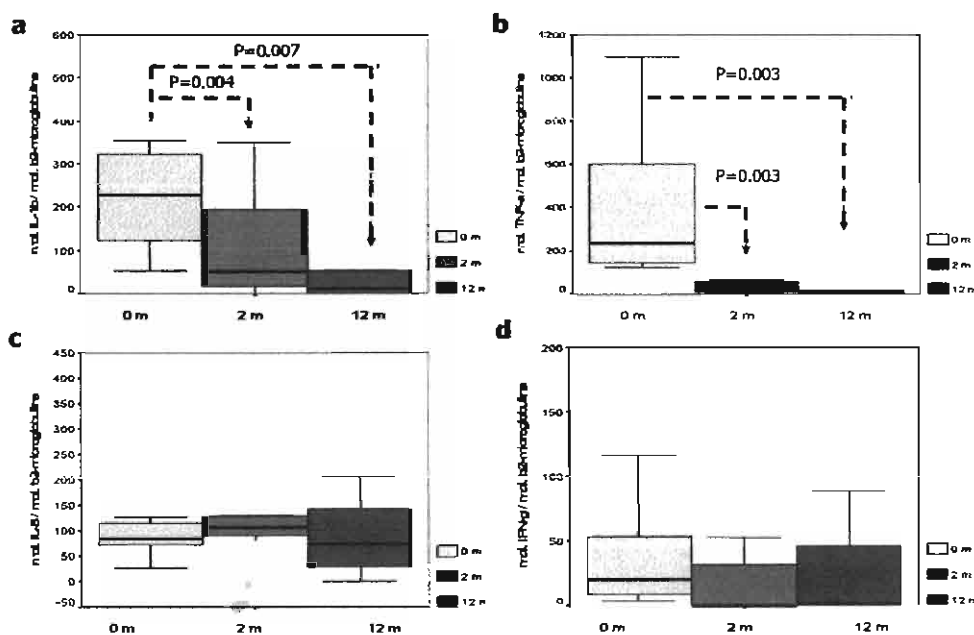


Figura 16. Expresión de ARNm de citocinas en tejido hepático en pacientes que recibieron PTX durante 12 meses; a) IL-1 β , b) TNF- α , c) CXCL-8/IL-8 y d) IFN- γ . La expresión se expresa en moléculas de citocina/10⁵ moléculas de β 2-microglobulina.

Tabla 6. Expresión de IL-1 β , TNF- α , CXCL-8/IL-8 y IFN- γ en tejido hepático del grupo de pacientes que recibieron PTX, a los 0, 2 y 12 meses de tratamiento.

Citocina	PTX		
	0 m	2 m	12 m
IL-1 β	276/227 (53-704)	136/50* (0-512)	70/11* (0-443)
TNF- α	776/236 (125-4943)	75/23* (3-399)	13/12* (0.4-50)
CXCL-8/IL-8	111/84 (27-407)	122/105 (27-332)	102/72 (0.4-358)
IFN- γ	40/20 (4-120)	22/0.4 (0.4-124)	42/1 (0-188)

Los valores se expresan como medias/medianas (mínimo-máximo). n=11

Expresión se expresa en moléculas de citocina/10⁵ moléculas de β 2-microglobulina. * p< 0.05.

2. Aminotransferasas

No hubo diferencias significativas entre los 3 tratamientos, en cuanto a los valores de aminotransferasas.

La COL no tuvo efecto sobre los niveles de ALT y AST (**tabla 7, figura 17a**). El IFN- α únicamente tuvo efecto de forma significativa sobre la AST a los 12 meses de la administración del medicamento (82 vs. 60 UI/ml, $p= 0.043$), **tabla 7 y figura 18a**. Mientras que la PTX disminuyó los niveles de ALT desde los 2 meses (111 vs. 83 UI/ml, $p=0.004$) y continuó así hasta los 12 meses (111 vs. 64 UI/ml, $p=0.026$), sobre la AST la disminución fue significativa hasta los 12 meses (123 vs. 67 UI/ml, $p=0.021$), **tabla 7, figura 19a**.

Tabla 7. Distribución de los valores de ALT y AST por tratamiento y tiempo de seguimiento (0, 2 y 12 meses) de pacientes con Hepatitis C crónica.

Tratamiento	n	ALT			AST		
		0 Mes	2 Meses	12 meses	0 Mes	2 meses	12 meses
COL	8	86/93 (27-152)	152/82 (39-542)	104/50 (28/278)	86/73 (24-202)	98/72 (30-258)	77/47 (25/210)
IFN-- α	7	95/70 (21-195)	88/48 (23-205)	66/59 (17-127)	82/81 (21-136)	77/42 (24-173)	60/39* (19-114)
PTX	11	111/104 (45-243)	83/60* (27-131)	64/60* (19-177)	123/108 (40-308)	117/84 (35-309)	67/46* (14-161)

Los valores se expresan como medias/medianas (mínimo-máximo).
La ALT y AST están reportadas en UI/L
 $p < 0.05$.

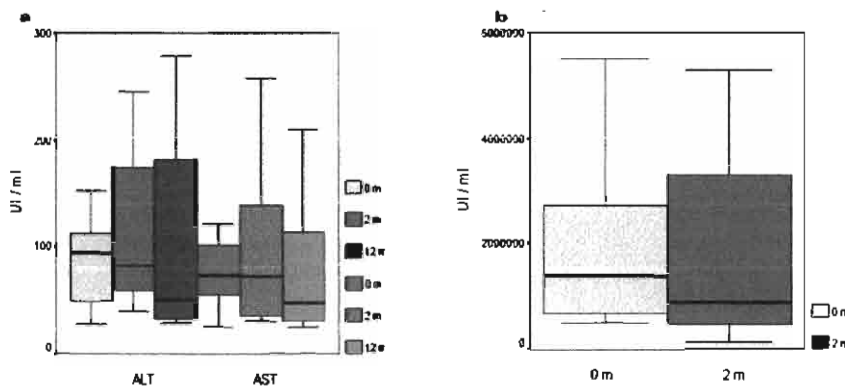


Figura 17. Niveles de a) ALT y AST; b) carga viral en pacientes que recibieron COL. Las determinaciones de ALT y AST se realizaron a los 0, 2, 12 meses mientras que la carga viral únicamente se midió a los 0 y 2 meses.

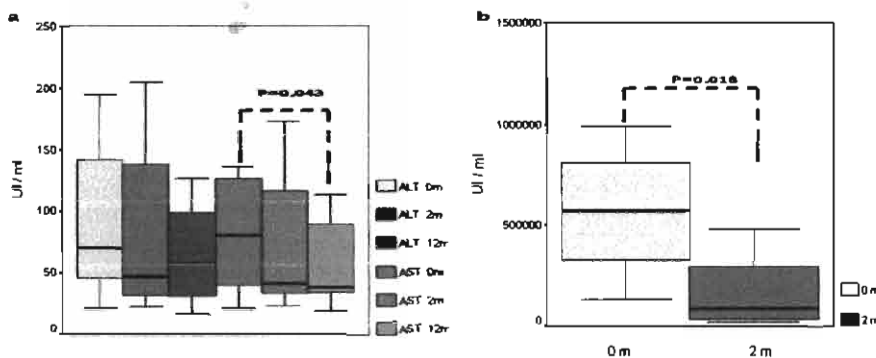


Figura 18. Niveles de a) ALT y AST; b) carga viral de pacientes que recibieron IFN- α . Las determinaciones de ALT y AST se realizaron a los 0, 2, 12 meses mientras que la carga viral únicamente se midió a los 0 y 2 meses.

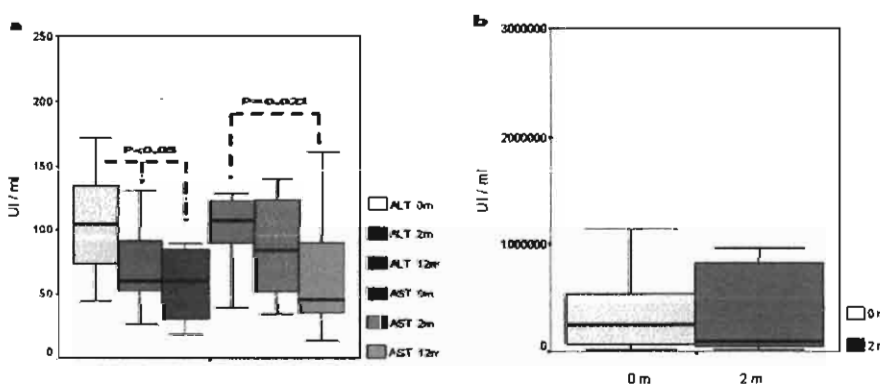


Figura 19. Niveles de a) ALT y AST, b) carga viral de pacientes que fueron tratados con PTX. Las determinaciones de ALT y AST se realizaron a los 0, 2, 12 meses mientras que la carga viral únicamente se midió a los 0 y 2 meses.

3. Carga viral

La carga viral inicial fue diferente entre los 3 grupos de estudio. Al inicio, los pacientes del grupo de COL tuvieron cargas virales dos veces más altas que los pacientes del grupo de IFN- α : 1.9×10^6 UI/ml vs. 947 000 UI/ml y de los pacientes que recibieron PTX; 614 000 UI/ml ($p=0.011$). Después de 2 meses de tratamiento el efecto sobre la CV fue más evidente con la administración de IFN- α : 180 000 UI/ml teniendo cargas virales menores que los pacientes que recibieron COL: 909 000 UI/ml y PTX: 521 000 UI/ml (cinco y dos veces más bajas, respectivamente) ($p=0.018$). Se confirmó el efecto antiviral que tiene el IFN- α , aunque no alcanzaron valores no detectables tabla 8. La COL no tuvo efecto sobre la carga viral (figura 17b). El IFN- α , disminuyó la carga viral a los 2 meses de tratamiento 947,200 vs. 180,251 UI/ml, figura 18b ($p=0.018$). La administración de PTX no ocasionó ningún efecto sobre la carga viral, por consiguiente no tiene actividad antiviral, figura 19b. Los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Carga viral del VHC en suero de pacientes con HCC, por tratamiento y tiempo de seguimiento (0 y 2 meses) de pacientes con Hepatitis C crónica.

Tratamiento	n	0 Mes	2 Meses
COL	8	1 952 675 (509 ³ -5.5 ⁶)	2 142 125 (131 ³ -7.5 ⁶)
IFN- α	7	947 200 (131 ³ -3.6 ⁶)	180 251* (23 ³ -476 ³)
PTX	11	614 072 (23 ³ -3.5 ⁶)	530 514 (23 ³ -2.2 ⁶)

Los valores se expresan como medias (mínimo-máximo).
La Carga Viral es reportada en UI/ml. * $p < 0.05$.

4. Histopatología

En la **tabla 9** se muestran los resultados del análisis histopatológico de las biopsias hepáticas antes y durante el tratamiento con los diferentes medicamentos, donde se observa que no hubo cambios significativos en el METAVIR después del tratamiento.

Por consiguiente la COL, el IFN- α y la PTX no ocasionaron algún cambio en el análisis histopatológico (METAVIR) en las biopsias hepáticas de los pacientes que recibieron tratamiento.

Tabla 9. Resultados histopatológicos de la biopsia hepática, por tratamiento y tiempo de seguimiento (0, 2 y 12 meses) de pacientes con Hepatitis C crónica.

Tratamiento	Edad	Basal	METAVIR	
			2 meses	12 meses
COL	51	F2	F2	F2
	(43-57)	F1-F3	F1-F3	F1-F4
IFN- α	38	F2	F2	F2
	(21-56)	F1-F4	F2-F4	F1-F4
PTX	51	F2	F2	F2
	(20-63)	F1-F4	F1-F4	F1-F4

Los valores se expresan como medias (mínimo-máximo).

RESUMEN DE RESULTADOS

a. Colchicina

La COL a nivel periférico mostró actividad antiinflamatoria ya que disminuyó la expresión de TNF- α e IFN- γ a partir de los 2 meses y hasta el año, lo que indica que tiene efecto sobre la expresión de algunas citocinas pro-inflamatorias, este efecto fue diferencial y más evidente sobre IFN- γ . El efecto de la COL en la secreción de IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ fue importante a los 12 meses, pero no tuvo efecto sobre CXCL-8, así la COL ocasionó en CMNs, la disminución significativa tanto del ARNm como de la secreción de TNF- α e IFN- γ , solo tuvo efecto en la secreción de IL-1 β y ningún efecto sobre CXCL-8. Lo que implica que modificó la expresión y secreción de estas dos citocinas en CMN de sangre periférica, probablemente sea un potencial modulador de estas citocinas pro-inflamatorias en el torrente sanguíneo, y así participar en la inhibición del proceso inflamatorio en hepatitis C. Mientras que en la biopsia hepática, la COL ocasionó un aumento del ARNm de CXCL-8 a los 2 meses induciendo la actividad celular en el hígado habiendo aumento de mediadores celulares y atracción de células al sitio de daño de forma aguda, el aumento de IL-8 puede ocasionar infiltración celular, probablemente para mantener la homeostasis en el tejido hepático. Además observamos que la COL tiende disminuir la expresión de IL-1 β a los 2 y 12 meses en tejido hepático, por consiguiente puede tener propiedades antiinflamatorias, pero es importante indicar que la COL tiene un efecto dual en etapa temprana de tratamiento, ya que a los 2 meses en la biopsia hepática causó la disminución de la expresión de IL-1 β y por otro aumentó el ARNm de CXCL-8.

b. IFN- α

En las CMNs después de un año de tratamiento el IFN- α solo disminuyó la expresión de la IL-1 β además provocó la disminución de la secreción de IL-1 β , e IFN- γ , a partir de los 2 meses y la disminución de TNF- α , solo se observó al año de tratamiento. Mientras que en tejido redujo la expresión de TNF- α a partir de los 2 meses de tratamiento, lo que implica que el IFN- α ocasionó diferentes resultados en sangre periférica y en tejido hepático de pacientes con hepatitis C, ya que en sangre periférica el principal efecto fue sobre IL-1 β , mientras que en tejido fue sobre TNF- α , es importante hacer notar que los genes de ambas citocinas son estimulados de forma sinérgica ocasionando que las proteínas se produzcan al mismo tiempo

En este grupo de pacientes, la expresión de IL-1 β fue mayor en la biopsia hepática que en las CMNs ($p=0.028$) a los 12 m, valores más altos de IFN- γ , también se observaron en la biopsia que en las CMNs a los 2 meses ($p 0.028$). Es decir el ARNm se expresó mucho más en el tejido que en las CMNs, pero en diferente etapa del tratamiento. Mientras que la expresión de TNF- α y CXCL-8 fue mayor en tejido que en CMNs al inicio, 2m y 12 meses ($p < 0.05$), probablemente el medicamento modificó estas citocinas de la misma forma en las CMNs y en la biopsia hepática de los pacientes con hepatitis C, ya que los niveles de expresión fueron más altos en la biopsia que en las CMNs durante el período de estudio.

Al comparar la secreción de las diferentes citocinas estudiadas encontramos que durante todo el tratamiento la CXCL8 siempre se secretó en mayor cantidad que las otras 3 citocinas ($p < 0.05$). TNF- α tuvo valores más altos que IL-1 β durante el tratamiento ($p < 0.05$). Aunque la expresión de IL-1 β fue mayor que la expresión de

TNF- α en los pacientes que recibieron este tratamiento, no implica que el ARNm sea transcrito a una proteína, ya que la secreción en el caso de estas 2 citocinas tuvo un patrón inverso, es decir la secreción de IL-1 β fue menor que la secreción de TNF- α . Probablemente esto se deba a mecanismos postranscripcionales que son necesarios para obtener una proteína madura o tal vez inhibidores de IL-1 β (probablemente el medicamento), que ocasionan que su secreción sea menor.

Nuestros datos concuerdan con lo reportado en la literatura, el IFN- α , funcionó como agente antiviral ya que disminuyó la carga viral del VHC y a nivel sistémico como inmunomodulador de la expresión y secreción de IL-1 β , también de la secreción de TNF- α e IFN- γ después de un año de tratamiento, un hallazgo importante fue el efecto que ocasionó en el tejido hepático al disminuir el ARNm de TNF- α . El IFN- α al reducir citocinas pro-inflamatorias disminuyó el proceso inflamatorio involucrado en el daño hepático, pero debido a que no tuvo ningún efecto sobre CXCL-8, probablemente sea necesario incluir otro fármaco (terapia combinada) que incremente la acción inmunomoduladora del IFN- α . Aunque el IFN- α inhibió la replicación pero no eliminó por completo al VHC, no ocasionó cambios en la síntesis de IL-8, se ha descrito que las proteínas virales inducen esta quimiocina, probablemente al no erradicar el virus la expresión y secreción se deba a que el gen se encuentra estimulado de forma constante aunque el estímulo por las proteínas del VHC sea menor.

c. PTX

Encontramos que la PTX en CMNs causó los siguientes cambios en la expresión y secreción de las citocinas estudiadas: la expresión de IL-1 β disminuyó gradualmente

a partir de los 2 meses y hasta el final del tratamiento, mientras que TNF- α aumentó a los 2 meses y al año de tratamiento disminuyó la expresión del ARNm casi 8 veces con respecto a sus valores basales. Otro esquema diferente presentaron CXCL-8 e IFN- γ su expresión disminuyó a los 2 meses y a los 12 meses aumentó el ARNm de estas moléculas pero no de manera significativa, lo que indica que el efecto de la PTX sobre CXCL8 e IFN- γ fue a plazo corto mientras que para el TNF- α su acción fue a largo plazo, y por último inhibió la síntesis de IL-1 β a partir de los 2 meses, por lo tanto la actividad antiinflamatoria de la PTX fue más evidente sobre IL-1 β

Las secreciones de IL-1 β y TNF- α iniciaron con valores arriba de 1000 pg/ml y después de 12 meses, la PTX disminuyó casi 7 veces la secreción de IL-1 β (1151 vs. 147 pg/ml), mientras que el efecto sobre TNF- α fue mucho menor, solo los valores bajaron 2 veces (1073 vs. 503 pg/ml) con respecto a su basal, es decir su acción antiinflamatoria fue más evidente sobre IL-1 β , además la PTX disminuyó la secreción de CXCL-8 e IFN- γ al año de tratamiento. Por lo anterior, el fármaco tuvo efecto antiinflamatorio a nivel periférico, ya que disminuyó la expresión y secreción de citocinas en CMNs de pacientes con HCC.

Previamente se ha demostrado tanto en animales como en humanos, el efecto de la PTX sobre TNF- α y nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado por otros grupos, pues redujo la expresión de IL-1 β y TNF- α en la biopsia hepática a partir de los 2 meses y este efecto se extendió hasta al año de tratamiento, por consiguiente modificó la expresión de estas citocinas pro-inflamatorias a nivel periférico y en tejido hepático. La PTX además descendió la secreción de IL-1 β y TNF- α , las cuales son moléculas que disparan el proceso inflamatorio en hepatitis C, tuvo un efecto menos

evidente (solo a los 12 meses) sobre la secreción CXCL8 e IFN- γ , la PTX fue único fármaco de los 3 que estudiamos que redujo la secreción de IL-8. Además causó una buena respuesta bioquímica ya que disminuyó las enzimas hepáticas: ALT durante todo el tratamiento y AST solo a los 12 meses.

DISCUSION:

En la actualidad continúa siendo motivo de controversia como se produce el daño en el hígado después de la infección por el VHC, si es por promover el deterioro celular hepático a través de un efecto citopático (23, 36) o bien como producto de la respuesta inmune antiviral intrahepática (22, 79, 114, 219). Debido a su notable variabilidad, el VHC posee una marcada habilidad para eludir la acción del sistema inmune y conducir a un proceso crónico. El sistema inmune controla de forma parcial la infección viral, pero debido a un largo proceso inflamatorio, el daño hepático persiste y progresa. Hasta el momento no existe una explicación convincente que sugiera el porqué de la evolución a la cronicidad de la infección en presencia de una respuesta inmune funcional (114). La respuesta inmune se desempeña como mediadora del daño celular a través del aumento de moléculas de adhesión y es regulada por la secreción diferencial de citocinas (22, 79, 103, 220) lo que mantiene la infección activa durante muchos años.

La infección por el VHC no induce inmunidad protectora y la re-infección puede ser fácilmente demostrada. La inmunoregulación es importante en HCC, en los linfocitos periféricos la proteína core, la NS3 y la NS4 son las más inmunogénicas y las dos últimas son específicas de los linfocitos CD4, alterando la actividad de las células NK,

CD4 y CD8 (10, 17-19, 22, 90, 221). Sin embargo hay una relación inversa entre respuesta CD4 y niveles de anticuerpos en pacientes infectados. Por lo tanto, una respuesta celular fuerte a la proteína core aparentemente favorece el curso benigno de la infección (219).

La respuesta de los CTL's (CD8+) a las proteínas virales ha sido caracterizada en sangre periférica y en tejido hepático siendo policlonal y multiespecífica. La función de los CTLs es matar a las células infectadas por el VHC a través de la vía perforina/granzima, además liberan Fas ligando y citocinas inflamatorias como IFN- γ . Estas moléculas efectoras solubles liberadas participan en el control de la infección, además destruyen células hepáticas no infectadas y pueden atraer linfocitos sin especificidad para el VHC e invadir el hígado. El daño de estas células inflamatorias no específicas puede expandir el daño tisular disparado el VHC y finalmente activar la fibrogénesis en el hígado. (17, 18, 90).

Además, los linfocitos T que actúan de forma específica contra el VHC, se convierten en no respondedores y aparentemente desaparecen a través de varios mecanismos, tales como mutaciones en epitopes críticos que permiten el escape del virus, ayuda ineficiente, anergia clonal o expansión de células T reguladoras (90, 222) lo que ha sido asociado con la falla para eliminar el virus y mantener el curso crónico de la enfermedad, por lo que factores genéticos, inmunológicos y virológicos pueden influir en la inducción diferencial de células T en HCC (223).

La mayoría de las enfermedades hepáticas agudas y crónicas se caracterizan por la presencia de un proceso inflamatorio que generalmente se extiende como resultado

del balance entre la expresión de varias citocinas pro y anti-inflamatorias en el hígado. (100, 103).

Múltiples investigaciones han considerado como conceptual el paradigma del balance entre citocinas pro y anti inflamatorias (Th1/Th2), siendo el evento central que determina el curso que pueda seguir la infección por el VHC, la información existente hasta la fecha es sin embargo controversial ya que algunos autores consideran que el perfil Th1 colabora a la resolución de la enfermedad y otros lo asocian con la actividad y progresión de la enfermedad (128, 224). Hay incluso investigadores que consideran que las citocinas Th2 están implicadas en la patogenia y gravedad de la enfermedad (225).

Las citocinas pro-inflamatorias en general, ocasionan una respuesta que ocurre fundamentalmente en el hígado pero también puede suceder a nivel periférico, en particular en células T y monocitos. (17, 18, 21, 90). En el presente trabajo se aborda el problema de la hepatitis C crónica desde la perspectiva de que el infiltrado inflamatorio no es únicamente importante en la fase aguda sino que la producción crónica de citocinas en las células mononucleares periféricas y en el hígado pueden entonces asumir un papel significativo en la fisiopatología de la enfermedad e incluso ser un posible blanco terapéutico.

La producción constitutiva de citocinas en el hígado es baja o está ausente en condiciones normales, sin embargo si las células son activadas por algún estímulo

fisiológico o patológico la producción de citocinas aumenta (90, 100, 115), puede ser autocrina, paracrina y/o endocrina incrementando las moléculas efectoras que organizan la respuesta tisular a diferentes estímulos, además controlan la replicación viral y contribuyen al daño hepatocelular a través de la amplificación de la respuesta inmune no específica (117-124, 226). Nuestros resultados confirman que en los pacientes con HCC vírgenes a tratamiento existe en condiciones que experimentalmente para este estudio consideramos como basales, expresión y secreción de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y CXCL-8 en CMNs periféricas y también se encuentran presentes en el tejido hepático, lo que permite reconocer parte de la actividad pro-inflamatoria presente en pacientes con HCC.

El VHC a pesar de ser un virus hepatótrofo tiene la característica de tener importantes reservorios extrahepáticos habiéndose demostrado su presencia en riñones, piel, tejido linfoide, células hematopoyéticas y células mononucleares periféricas entre otras (53-63). Se ha sugerido que los leucocitos de sangre periférica tienen participación en la persistencia del VHC y en las implicaciones clínicas, pues además de reservorios, al mismo tiempo pueden ser participantes activos inadecuados en las reacciones inmunes antivirales (227,228). Diversos estudios han utilizado cultivos de CMNs derivadas de pacientes con HCC para estudiar las interacciones huésped-VHC (134, 229). En particular para los propósitos de la presente investigación está el hecho de que el VHC infecta CMNs de sangre periférica situación que dio lugar a que se decidiera llevar a cabo la medición de las

citocinas en cultivos de CMNs, evitando hacerlo en suero toda vez que las mediciones a este último nivel han arrojado resultados contradictorios (230).

Las técnicas de aislamiento y cultivo de CMNs previamente han sido descritas y validadas (132, 220), la medición de citocinas en estas células se llevó a cabo por duplicado, tanto en condiciones basales como después de la administración de los fármacos en estudio, en ningún caso se agregaron estimulantes celulares a los medios de cultivo con la finalidad de conocer la secreción "natural" de las citocinas. Todas las mediciones se realizaron después de 24 hrs. de cultivo.

En este trabajo la determinación basal de las citocinas fue muy importante pues estos niveles los empleamos como controles para el estudio de posibles modificaciones asociadas al empleo de los 3 fármacos, ya que el empleo de sujetos "sanos" o bien "históricos" introducen variables distintas que complican la interpretación de los resultados de una intervención terapéutica. Con esto en consideración, los pacientes con HCC recibieron tratamiento con COL, IFN- α o PTX por 12 meses, todos fueron genotipo 1. Los 3 medicamentos se escogieron de acuerdo a que estudios previos los han identificado como posibles agentes útiles ya sea por sus efectos antivirales directos y actividad inmunomoduladora que es el caso del IFN- α , la COL por sus efectos antiinflamatorios y antifibróticos y la PTX por su actividad antiinflamatoria al inhibir la producción de TNF- α , encontrando que los 3 fármacos modificaron de forma diferencial, la expresión y la secreción de estas citocinas en sangre periférica y con menor efecto en tejido hepático

La COL es un medicamento que se ha utilizado durante siglos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la gota o la fiebre mediterránea, en años recientes ha sido utilizada en padecimientos inmunológicos (153, 156), en enfermedad hepática alcohólica (163-167), en el manejo de las cirrosis hepática experimental y en humanos por su actividad antiinflamatoria, por su efecto sobre la producción de colágena o bien por sus propiedades antifibróticas (155-162 168-178). Todo ello nos llevó a evaluar su efecto sobre citocinas a nivel hepático y sistémico en HCC, ya que nadie ha evaluado su actividad sobre estas proteínas involucradas en el proceso inflamatorio.

En el tejido hepático encontramos que este fármaco disminuyó a partir de los 2 meses y así continuó hasta los 12 meses la expresión de IL-1 β , varios autores han reportado que IL-1 (α y β) son expresadas en el hígado principalmente en macrófagos, células T, células estelares activadas y células endoteliales sinusoidales (136). La IL-1 β es una citocina que participa de forma importante en la respuesta de fase aguda y en la activación de las células de Kupffer. Se conoce que el promotor del gen de IL1 β es activado por la proteína core del VHC principalmente a través de la vía de NF κ B, dando lugar a la reacción inflamatoria inducida por el virus (231), nuestros resultados muestran que la IL-1 β en el tejido hepático fue inhibida por la COL, lo que sugiere que el medicamento posee actividad antiinflamatoria, pero no es lo suficiente fuerte para modular las otras citocinas estudiadas. Sin embargo, otros autores sugieren que *in vitro* la IL-1 participa en la eliminación del virus y promueve a 1-8U, un gen que se

estimula por el IFN, el cual exhibe actividad antiviral. (232). Además este fármaco estimuló en tejido la expresión de CXCL-8/IL-8, quimiocina que consiste de una secuencia de CXC, la cual contiene un solo residuo de aminoácidos interpuesto entre dos cisteínas (233, 234), atrae neutrófilos y linfocitos a sitios de inflamación, participando en la persistencia del proceso inflamatorio en el hígado (132, 146), la CXCL-8/IL-8 es producida después de la estimulación con numerosos agentes endógenos y exógenos, tales como endotoxinas, virus, bacterias, IL-1 y TNF- α (235, 236).

El efecto de la COL fue dual ya que por un lado inhibió la activación de las células de Kupffer al disminuir IL-1 β y por consiguiente disminuyó la activación de la cascada de mediadores celulares que disparan estas células y producen inflamación durante la HCC, y por otro aumentó la producción del ARNm de IL-8 que recluta un mayor número de células en el sitio de daño, este efecto fue transitorio ya que a los 12 meses esta quimiocina disminuyó a los niveles basales. Además, los pacientes que recibieron COL tuvieron aumento en la carga viral a los 2 meses, tal vez esto explique el aumento de la expresión del ARNm de IL-8, pues se ha demostrado que las proteínas virales activan la síntesis de esta quimiocina y por consiguiente esta activación tiene un papel fundamental en la patogénesis de la hepatitis C. Estudios *in vitro* han encontrado que la proteína core activa al promotor de CXCL-8 (237), las proteínas estructurales (146), no estructurales (137, 145, 248-250) y la proteína E2 aumentan la producción de esta quimiocina (238), además el VHC induce la producción de TNF- α y CXCL-8 (239). Recientemente se ha demostrado a nivel

hepático que el VHC dispara las vías de señalización del ARN de doble cadena que inducen IL-8 por activación transcripcional ($\text{NF}\kappa\text{B}$, IRF3, ISRE) y estabilización del ARNm de RIG, formando así un enlace regulatorio específico entre las respuestas antiviral innata y celular inflamatoria contra la infección viral (240). Shimoda y cols. (241) encontraron en pacientes con HCC una asociación entre altas concentraciones del ARNm de IL-8 y fibrosis severa en biopsias hepáticas, además se ha reportado una asociación entre los niveles séricos de IL-8 y la respuesta a la terapia antiviral (242).

En este estudio encontramos que en los pacientes que recibieron COL tuvieron niveles altos de ARNm en etapa temprana del tratamiento, no encontramos asociación entre los niveles de CXCL-8 y el grado de fibrosis. Probablemente al continuar replicando el VHC, las proteínas virales promovieron la síntesis de CXCL-8, lo que muestra la capacidad que tiene el virus para inducir específicamente esta quimiocina y mantener el proceso inflamatorio y así representar una estrategia clave para evadir el sistema inmune del huésped, tal vez este fue el mecanismo que evitó que la COL ejerciera sus funciones antiinflamatorias y/o antifibróticas.

A nivel periférico la COL disminuyó la IL-1 β , el TNF- α y el IFN- γ , no tuvo efecto sobre la CXCL-8/IL-8. Este patrón de efectos sobre citocinas confirma el hecho de que en CMNs, este fármaco participa disminuyendo la reacción inflamatoria, como lo ha encontrado otro grupo (243). Es bien sabido que la IL-1 β , el TNF- α , la CXCL-8 y el IFN- γ tienen un papel importante en la patofisiología de la HCC (76, 127, 134, 242-

245). Además observamos que las mediciones a nivel periférico no reflejan lo que sucede en el tejido hepático de los pacientes con HCC después de recibir COL, ya que las citocinas que se modificaron en tejido fueron diferentes a las de CMNs.

En resumen los efectos de la COL se reflejan fundamentalmente en su actividad antiinflamatoria a nivel de CMNs por la disminución en la producción de citocinas proinflamatorias. Los efectos que aquí encontramos sobre la quimiocina CXCL-8 explican los mecanismos de resistencia viral a los efectos antifibrogénicos de la colchicina en el hígado.

El IFN- α se conoce que interactúa con la respuesta inmune del huésped (246, 247) pero además su actividad se ha correlacionado con el número de mutaciones dentro de la proteína viral NS5A, los mecanismos funcionales aún son desconocidos (137, 145, 248-250). El IFN afecta las actividades de macrófagos, células NK, células dendríticas y células T, es decir puede intervenir tanto en la presentación del antígeno, el tráfico celular y la diferenciación celular resultando en un aumento de las funciones antivirales (251, 252). Se ha reportado que aunque los pacientes alcancen respuesta viral sostenida después del tratamiento antiviral, el VHC persiste en CMNs y en el tejido hepático (43).

Nuestros resultados mostraron que en el tejido hepático el IFN- α disminuyó la expresión de TNF- α ocasionando la inhibición parcial del proceso inflamatorio que acontece en la HCC (no tuvo efecto sobre todas las citocinas que medimos), el TNF- α

se expresa en hepatocitos, células de Kupffer, células T, células estelares activadas y células endoteliales del sinusoides. Los hepatocitos son capaces de aumentar la producción de TNF- α en respuesta al daño hepático, incluyendo el daño por el VHC (136, 252), se ha reportado que en hepatitis C, los niveles séricos elevados de TNF- α reflejan la intensidad de lesiones inflamatorias que disminuyen después de la terapia antiviral (253,254) y correlaciona con la mejoría clínica de los pacientes (254), el uso de fármacos que inhiben la activación de los hepatocitos limita el daño tisular. Las lesiones hepáticas se deben a la respuesta inmune local, que puede ser amplificada por la acumulación de las células T específicas contra el VHC, las cuales son reclutadas por moléculas de adhesión y quimiocinas (252, 255, 256). Sugiriendo que la severidad de las lesiones hepáticas está relacionada a la expresión local de citocinas Th1, como lo es TNF- α (21, 127-129, 253).

Los pacientes antes de iniciar el tratamiento con IFN- α en el tejido hepático tuvieron aumentada la expresión de ARNm de CXCL-8/IL-8 (602 moléculas/10⁵ moléculas de β 2-microglobulina) y estos niveles se mantuvieron altos aún con la administración del IFN- α , hecho que sugiere que esta quimiocina y algunas citocinas como IL-2 e IL-6 juegan un papel importante en la patogénesis de la hepatitis C (257). Al respecto es necesario insistir que en observaciones previas se ha documentado el hecho de que la expresión de la proteína NS5A induce y aumenta CXCL-8 y que esto se asocia *in vitro* con inhibición de los efectos antivirales del IFN- α (137, 145,147,148, 248-250), lo que puede representar una estrategia de evasión viral. Estudios *in vitro* han encontrado que la proteína core activa al promotor de CXCL-8 (237), las proteínas

estructurales (146), y la proteína E2 aumentan la producción de esta quimiocina (238), además el VHC induce la producción de TNF- α y CXCL-8 (239). Se ha demostrado que el VHC a nivel hepático dispara las vías de señalización del ARN de doble cadena que inducen IL-8 al activar factores de transcripción como NF κ B, IRF3, ISRE y estabilizar el ARNm de RIG, constituyendo un enlace regulatorio específico entre las respuestas antiviral innata y celular inflamatoria contra la infección viral (240). En un estudio donde se expusieron células endoteliales de vena umbilical humana a partículas parecidas al VHC (VHC-LPs) se ocasionó la liberación de CXCL-8 vía NF κ B lo que disparó la apoptosis mediada por Fas (146), y se demostró que estas partículas inducen el aumento de Fas-L y activación de caspasa 3, es decir que la CXCL-8/IL-8 tiene la capacidad de inducir la apoptosis de células infectadas por el VHC (146, 256).

Con respecto al efecto que tuvo el IFN- α sobre las citocinas estudiadas en CMNs, encontramos que disminuyó tanto la expresión como la secreción de IL-1 β a partir de los 2 meses de recibir medicamento, pero no tuvo ninguna acción sobre esta citocina en el hígado, lo que muestra que el efecto que tuvo el IFN- α a nivel sistémico no necesariamente indica lo que sucede en el hígado, si bien disminuyó la secreción de TNF- α e IFN- γ , no tuvo efecto sobre la CXCL-8. Estos resultados aluden por lo tanto al efecto antiinflamatorio del IFN- α a nivel periférico.

Polyak y cois (137) describieron en pacientes con VHC una asociación entre los niveles séricos pretratamiento de CXCL-8 y la respuesta bioquímica al tratamiento

con IFN- α (monoterapia), en este estudio encontramos que los niveles de CXCL-8 siempre fueron valores altos y únicamente disminuyó AST significativamente después de un año de tratamiento con IFN- α , es decir ninguno de los pacientes alcanzó respuesta bioquímica, cabe aclarar que medimos CXCL-8 en sobrenadantes de cultivos de CMNs que refleja lo que las células secretan al medio durante el cultivo, mientras que la determinación en suero es un resultado que muestra los niveles que circulan en el organismo.

La eficacia de la monoterapia con IFN en el sistema de replicación del VHC ha sido reportada utilizando IFN- α , IFN- γ , IFN- β . En un estudio clínico evaluaron el tratamiento de la HCC que involucró la administración secuencial de IFN- α seguido por IFN- γ (IFN- α 2b + IFN- γ), donde obtuvieron mejores resultados que la monoterapia con IFN- α (246, 247). Debido a que nuestros resultados muestran que el IFN- α , no modificó todas las citocinas es indispensable plantear la posibilidad de utilizar terapias combinadas como una estrategia para mejorar el arsenal terapéutico contra la infección crónica por VHC.

Es bien conocido el efecto antiviral que tiene en el IFN-a sobre el VHC, corroboramos ese efecto que se ha descrito pero no se alcanzan valores no detectables de carga viral, es importante resaltar que aunque actualmente el IFN-a que se administra a los pacientes es pegilado y es una terapia combinada con Ribavirina.

En resumen nuestros resultados sugieren que el IFN- α actúa fundamentalmente sobre la expresión en hígado de TNF- α y que a nivel de las CMNs modificó también la secreción de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y la expresión de IL-1 β .

La PTX es un medicamento de reciente interés en cuanto a su empleo en padecimientos hepáticos (189-191,195,197,200-204, 209, 213-215, 258-260) basado fundamentalmente en la demostración de su efecto antiinflamatorio, inmunomodulador, su capacidad para inhibir la producción de colágena, y el bloqueo de citocinas (188-215, 258-260).

Nuestros datos revelaron que la PTX tuvo efecto en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias tanto en tejido hepático como en CMNs de pacientes con HCC. En particular en el tejido hepático se observó disminución de la expresión de IL-1 β y TNF- α a partir de los 2 y hasta los 12 meses de tratamiento, resultados similares a los previamente observados en SIDA y enfermedad hepática alcohólica (193, 197, 200-202, 259-261). Es decir la PTX ocasionó una pausa o lentitud en la inflamación ya que redujó los niveles hepáticos y sistémicos de IL-1 β , TNF- α y a nivel periférico ALT, la expresión de CXCL-8 e IFN- γ se mantuvieron similares durante los 12 meses de tratamiento.

La IL-1 (α y β) y el TNF- α han sido reportadas como citocinas reguladoras en el daño hepático (75, 86, 90, 98, 100, 126-131, 133-136, 243-245). El TNF- α puede directamente controlar la infección viral (75-77, 88, 243), en regeneración hepática es

necesario para la proliferación de hepatocitos, además es un mediador de muerte (100, 115, 136, 256). Durante la infección por el VHC se ha indicado que los niveles séricos de TNF- α correlacionan con la severidad de la necroinflamación hepática (253, 254), en hepatitis alcohólica se ha encontrado que la PTX disminuyó la mortalidad (200-202, 260, 261), lo que apoya que la PTX tiene efectos antiinflamatorios en enfermedades hepáticas.

La IL-1 y TNF- α se expresan en el hígado principalmente en células de Kupffer, células T, células NK, células sinusoidales (136). Se ha demostrado que la IL-1 β y el IFN- γ participan en la inducción de las proteínas de fase aguda, en la auto-activación de células de Kupffer, aumentan la respuesta del sistema inmune (246, 247), y estimulan la producción de metaloproteasas (MMPs) de MEC, las cuales son importantes en la inhibición de la síntesis de colágena e interfieren en la formación de MEC revelando la vulnerabilidad del hígado al daño (88, 98, 133, 136, 243, 244). Tanto IL-1 β como TNF- α inducen otras citocinas y quimiocinas que pueden aumentar la regulación de moléculas de adhesión, promover la activación celular, el reclutamiento y aumento de la citotoxicidad de los linfocitos, macrófagos y neutrófilos (88, 98, 127, 243, 244), sin embargo, en los pacientes estudiados la dosis de la PTX utilizada no tuvo efecto sobre la expresión en hígado de CXCL-8.

El TNF- α puede inhibir la replicación viral o inducir apoptosis de las células infectadas, además contribuye a la coordinación de la actividad de las células inmunológicas todo lo anterior sugiere que el TNF- α tiene un papel dual en las

infección por el VHC pues esta involucrado en mecanismos responsables de la eliminación de la viremia y en la patogénesis de la HCC (86). Las hepatitis B y hepatitis C presentan cambios significativos en la expresión de TNF- α y sus receptores, que se han correlacionado con la severidad de la enfermedad pero no con los parámetros virológicos (carga viral y genotipo), sugiriendo la activación del sistema TNF en enfermedades hepáticas relacionadas con el VHC (262).

El uso de fármacos como el IFN- α y la PTX es benéfico ya que al inhibir la producción de TNF- α y la activación de hepatocitos pueden limitar el daño tisular ocasionado indirectamente por la producción de las citocinas pro-inflamatorias inducidas por el VCH.

Se considera que la PTX tiene propiedades inmunomoduladoras que no sólo están asociadas al bloqueo de la producción de TNF- α sino además a la secreción de otras citocinas en CMNs y en diferentes tejidos (75, 88, 98, 100, 132, 188, 204, 207, 208, 213, 221, 225, 228, 230, 240, 253, 254, 257, 263-265). El efecto supresor sobre las citocinas pro-inflamatorias puede ser por la inhibición de la activación del factor de transcripción NF κ B (204).

A nivel periférico la PTX disminuyó en CMNs la expresión del ARNm de IL-1 β , CXCL-8 e IFN- γ , de manera importante a los dos meses. Debido a que la farmacocinética y el metabolismo de la PTX no han sido totalmente estudiados en pacientes con disfunción hepática, en el presente estudio utilizamos una dosis total de 800 mg/día,

quizá esta dosis fue sin embargo insuficiente para mantener los efectos antiinflamatorios que ocasionó sobre la expresión del ARNm de las citocinas pues únicamente se presentó en los primeros meses.

Un hallazgo interesante en nuestro estudio fue que la PTX disminuyó en CMNs la secreción de las 4 moléculas estudiadas: IL-1 β , TNF- α , CXCL-8/IL-8 e IFN- γ . La CXCL-8 es una quimiocina liberada por macrófagos que atrae varios leucocitos a los sitios de infección, incluyendo neutrófilos, linfocitos T y basófilos, su expresión es inducida por IL-1 β y TNF- α (137, 248, 249, 255) y proteínas virales (143, 145, 146, 238-240). Por otro lado el IFN- γ inhibe la replicación viral en células infectadas y estimula la presentación de antígenos por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II (243, 245-247). La medición de citocinas en diferentes sitios tales como células de sangre periférica versus tejido hepático puede conducir a diferentes observaciones a cerca de la respuesta de células T a la infección viral. Además la medición del ARNm y los niveles de proteínas pueden producir resultados discordantes debido a que muchas cepas de VHC codifican análogos de citocinas, genes de proteínas o receptores de citocinas los cuales se unen a las citocinas y pueden modificar la expresión (ARNm) y la secreción (proteína) de esta moléculas (252).

Como ya se ha mencionado, la replicación del VHC puede ocurrir en CMNs y estas células pueden ser el transporte del virus a tejidos linfoides (6), ocasionando la inhibición de la respuesta inmune o de manera alterna secuestran viriones impidiendo

su reconocimiento (21). El hecho de que la PTX disminuyó las citocinas en CMNs probablemente refleja la inhibición del proceso inflamatorio que provoca la infección por VHC en estas células.

La importancia de la PTX como inhibidor del TNF- α a todos los niveles es de gran relevancia ya que modula una molécula con funciones opuestas ya que bajos niveles de TNF- α contribuyen a la protección y coordinación celular, mientras que cantidades excesivas de esta citocina pueden actuar como un factor que causa disfunción celular, daño tisular y muerte. Primordialmente la PTX inhibió la producción del ARNm de TNF- α e IL-1 β en la biopsia hepática y en sangre periférica, y la secreción de estas proteínas y de las otras citocinas medidas: IFN- γ y parcialmente de CXCL8. Cabe resaltar que de los 3 fármacos estudiados fue el único que disminuyó la expresión de TNF- α e IL-1 β en tejido y a nivel sistémico, es decir indujo la misma respuesta en ambos sitios. En resumen, en pacientes con HCC, la PTX tiene propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias, las cuales están asociadas con la inhibición selectiva y la liberación de citocinas.

La producción de citocinas y quimiocinas tanto localmente (en el hígado) como periférico juegan un papel importante como estimuladores o inhibidores de los procesos de daño dependiendo de su concentración y el tiempo en el cual las citocinas ejercen sus efectos biológicos relevantes (125-128, 226, 257, 258), además recientemente se ha demostrado que reflejan la progresión de la inflamación y fibrosis (266) por lo tanto pueden servir como biomarcadores de la infección por VHC. La PTX provoca una inhibición significativa en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, en

CMNs y en el hígado, además como sucede en otras enfermedades hepáticas, la PTX inhibió TNF- α en HCC. Los resultados que obtuvimos soportan el punto de vista que la PTX puede ser benéfica al inhibir la inflamación en estos pacientes. Los resultados indican que es importante explorar la PTX en futuros ensayos clínicos que incluyan otros fármacos o bien en pacientes no respondedores a tratamiento antiviral.

A nivel periférico, la COL y el IFN- α no tuvieron ningún efecto sobre CXCL-8/IL-8 y la actividad de la PTX fue mínima, ya que no hubo cambios significativos en la expresión y secreción en CMNs, lo mismo sucedió en tejido hepático ninguno de los tratamientos disminuyó la expresión de CXCL-8, sin embargo en aquellos pacientes que recibieron COL hubo aumento del ARNm tisular después de 2 meses de tratamiento, probablemente el medicamento y la presencia del virus replicando indujo la síntesis de CXCL-8 en hepatocitos y células de Kupffer, mientras que en el grupo de pacientes que recibieron IFN- α , iniciaron el estudio con valores elevados del ARNm de CXCL-8 y el medicamento no tuvo ningún efecto sobre la expresión en tejido de esta quimiocina, manteniéndose altos los niveles de CXCL8 durante los 12 meses de tratamiento, previamente se ha demostrado que niveles altos de CXCL-8 contribuyen a la inhibición de la respuesta inmune del huésped y de las acciones antivirales del IFN- α . Probablemente este sea un mecanismo de evasión viral que ocupa el VHC para escapar de sistema inmune del huésped y de los fármacos.

El IFN- α fue el único de los tratamientos que disminuyó la carga viral después de 2 meses de recibir el medicamento pero ninguno de los pacientes alcanzó valores

negativos, lo que refleja la inhibición de la replicación o eliminación del virus. En los pacientes con HCC antes de recibir tratamiento, el IFN- γ se encuentra en bajas concentraciones al compararlo con IL-1 β , TNF- α y CXCL-8 tanto en tejido hepático como en las CMNs, lo que demuestra las acciones de las proteínas virales sobre las citocinas. La proteína core ejerce una acción supresora en la producción de citocinas Th1, lo que tal vez refleja el efecto crónico que ocasiona el VHC, pues se ha reportado que los pacientes crónicos producen menor cantidad de IFN- γ e IL2 que aquellos que auto-limitan la infección (antes y después del estímulo con proteína core) (220, 225).

Existen contradicciones ya que otros grupos han encontrado que la producción de IFN- γ por CMNs en respuesta a la proteína core aumenta en los pacientes con HCC. (132, 228). Iwata encontró que en las CMNs de 24/46 pacientes hubo una mayor producción de IFN- γ después de adicionar proteína core, este es sintetizado por las células CD4+, en consecuencia la inmunidad celular a la proteína core puede ser importante en la patogénesis de la infección viral (265). La restauración del balance de citocinas puede contribuir a alcanzar resultados terapéuticos en HCC. (228, 267) Se ha demostrado que la secreción de IL-10/IL-12 de individuos sanos y de pacientes con enfermedades hepáticas es diferente, lo que muestra que estas citocinas tienen diferentes efectos dependiendo en quienes se midan y sobre la producción de otras citocinas. Así la modulación de la función de las células T y la producción de citocinas puede ser un mecanismo por el cual el IFN- α reduce la carga viral (264). En particular se ha demostrado que el IFN- γ juega un papel importante en la eliminación del virus o

resolución de la infección aguda por el VHC. (132, 263). Los efectos del IFN- γ incluyen la inhibición de la producción de los viriones del VHC por su efecto sobre el ARN y la síntesis de proteínas, aumento de la lisis inmune de las células infectadas por VHC (268), inhibe la fibrosis hepática y participa en la carcinogenesis inducida por el VHC, estos datos sugieren un defecto en la inmunidad celular relacionada con el VHC. (222).

Los niveles circulantes de citocinas no predicen la respuesta al tratamiento con COL e IFN- α , ya que no fue un cambio regular y constante en la secreción de las citocinas estudiadas. Otros investigadores encontraron resultados similares pero en los niveles de IL2 e IL-10 en un grupo de pacientes que recibieron IFN- α (269). El perfil de citocinas después de la terapia con IFN- α define una respuesta antiinflamatoria la cual al parecer no esa involucrada en la eliminación del VHC. El perfil de citocinas en leucocitos puede explicar la falla del sistema inmune para erradicar la infección crónica por VHC y sugiere que el tratamiento temprano en la fase aguda de la enfermedad con agentes que estimulen la respuesta citotóxica puede conducir a la erradicación de la infección viral (229).

Crews T y cols. (115) en varios estudios han demostrado la interacción de las citocinas en el cerebro, hígado y plasma de pacientes alcohólicos, encontrando que el incremento de TNF- α sistémico entra al cerebro, y ocasiona una prolongada neuroinflamación, modificando algunos factores de transcripción; disminuyendo CREB y aumentando NF κ B así como potenciando el glutamato además la evasión del

VHC a la respuesta inmune le permite al virus tener larga vida en el cerebro (94). En adición a la producción de citocinas pro-inflamatorias, los patógenos inducen la síntesis de citocinas inmunoreguladoras tales como IL-12 e IL-10 que juegan un papel en la activación de las células T específicas de antígenos y en la regulación antiinflamatoria, respectivamente (90). De acuerdo a esta información, nosotros creemos que la infección crónica por VHC induce la producción permanente de citocinas y el tipo de citocinas que se estimulen va a depender de la activación de diferentes receptores de membrana y del tiempo de evolución (adquisición) de la infección. De acuerdo a los datos obtenidos los medicamentos que estudiamos modifican de forma diferencial a las citocinas y la PTX es el fármaco con mayor actividad antiinflamatoria ya que disminuyó citocinas pro-inflamatorias (tanto en tejido como en sangre periférica) clave en el daño hepático y puede ser una alternativa para disminuir el proceso inflamatorio que es de gran relevancia en la HCC.

Aunque se han dado avances importantes en el conocimiento de la biología y fisiopatología de la hepatitis C. Hasta el momento no se conoce a detalle como sucede la infección crónica por VHC, aún falta y es un área importante de investigación para el conocimiento de la patogénesis inmune del VHC.

CONCLUSIÓN

El IFN- α fue el único fármaco que tuvo efecto antiviral. La PTX fue el medicamento que ocasionó la disminución de ALT y AST de manera temprana y se mantuvo hasta el final del tratamiento. La eficacia de los medicamentos fue mayor sobre la proteína madura (secreción) que sobre el ARNm de cada una de las citocinas estudiadas, a excepción de la PTX que disminuyó la expresión de IL-1 β y TNF- α en tejido hepático como a nivel sistémico.

Pocos son los estudios comparativos que se han realizado sobre la expresión de citocinas en células de sangre periférica y en el hígado antes y durante el tratamiento con diferentes fármacos no convencionales para el tratamiento de la hepatitis C. Nuestros resultados demuestran que las citocinas tienen una participación sustancial durante la enfermedad y dicha participación puede ser modificada por el tratamiento farmacológico. Además soportan el concepto que las citocinas no sólo son iniciadores del daño hepático sino continúan jugando un papel fundamental como mediadores y reguladores a lo largo de todas las etapas de la enfermedad. Es necesario considerar la posibilidad de una terapia combinada que aumente la respuesta de las células T y complemente el efecto de los fármacos antivirales para inhibir la replicación del virus. Además sería adecuado incluir un medicamento que actúe sobre el proceso inflamatorio que a largo plazo favorece el proceso crónico y el desarrollo de fibrosis y/o cirrosis, la PTX podría ser valorada como agente antiinflamatorio en ensayos clínicos que también incluyan la administración de IFN- α .

REFERENCIAS

1. Stephen D, Galtan J (1995) Gastroenterology. Physiology of the liver. W. B. Saunders, vol. 3, 5^a ed. Philadelphia, Penn. USA 540-560.
2. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2001; 161: III-XIII, 1-151.
- 3 Greenwell P, Geerts A, Ogata Y, Solis-Herrezco J, Rojkind M. (1994) The liver biology and pathobiology. Reven Press, New York 1367-1377.
4. Rojkind M, Greenwell P (1988). The liver as a bioecological system. The liver: biology and pathobiology. Reven Prees, New York 1269-1285.
5. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:51-62.
6. Hahn YS. Subversion of immune response by hepatitis C virus: immunomodulatory strategies beyond evasion? *Curr Opinion Imm* 2003; 15:443-449.
7. Schafer DF and Sorrell MF. Conquering Hepatitis C, Step by step. *N Engl J Med* 2000; 343: 1723-1724.
8. Bacon BR, Di Bisceglie AM. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001; 345:1425-1436.
9. Lauer GM and Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52.
10. Gale Jr M and Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436: 939-945.
11. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
12. Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo QL, Houghton M. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:1711-1715.
13. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:2451-2455

14. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14:381-388.
15. Ferreira-Gonzalez A and Shiffman ML. Use of Diagnostic Testing for Managing Hepatitis C Virus Infection. *Semin Liver Dis* 2004; 24 SUPPL 2: 9-18.
16. Rosen HR. Hepatitis C pathogenesis: Mechanisms of viral clearance and liver injury. *Liver Transpl* 2003; 9:S35-S43.
17. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of Hepatitis C Infection: Multifaceted strategies subverting innate and adaptative immunity. *Internal Med* 2006; 45: 183-191
18. Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: Innate and adaptative immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Research* 2006; 69:129–141.
19. Seth RB, Sun L, Chen ZJ. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Research* 2006; 16:141-147.
20. Racanelli V and Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003; 24: 456-464.
21. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in Microbiology* 2004; 12: 96-102.
22. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:215-229.
23. Missale G, Cariani E, Ferrari C. Role of viral and host factors in HCV persistence: which lesson for therapeutic and preventive strategies? *Dig Liver Dis.* 2004; 36:703-711.
24. Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000; 32(Suppl):98-112.
25. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl1): S21-S29.
26. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, Herion D, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 124:97-104.
27. Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000;20:17-35.

28. Buti M, San Miguel R, Brosa M, Cabases JM, Medina M, Angel Casado M, Fosbrook L, Esteban R. Estimating the impact of hepatitis C virus therapy on future liver-related morbidity, mortality and costs related to chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2005; 42:639-645.
29. Smith MW, Yue ZN, Korth MJ, Do HA, Boix L, Fausto N, Bruix J, Carithers RL Jr, Katze MG. Hepatitis C virus and liver disease: global transcriptional profiling and identification of potential markers. *Hepatology* 2003; 38: 1458-1467.
30. Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 2005; 436:930-932.
31. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzer A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter J. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288: 339–344.
32. Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30: 595-601.
33. Pawlostky JM. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 587-592.
34. Houghton M and Abrignani S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436:961-966.
35. Calderon E, Sanchez S. Consenso de diagnostico y seguimiento de casos positivos para el virus de la hepatitis C en Bancos de sangre. Centro Nacional de la Transfusión 2002.
36. Lindenbach BD and Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005; 436:933-938.
37. Vuillermoz I, Khattab E, Sablon E, Ottevaere I, Durantel D, Vieux C, Trepo C, Zoulim F. Genetic variability of hepatitis C virus in chronically infected patients with viral breakthrough during interferon-ribavirin therapy. *J Med Virol* 2004; 74:41-53.
38. Kleter B, Brouwer JT, Nevens F, Van Doorn LJ, Elewaut A, Versieck J, Michiels PP, Hautekeete ML, Chamuleau RA, Brenard R, Bourgeois N, Adler M, Quint WG, Bronkhorst CM, Heijntink RA, Hop WJ, Fevery J, Schalm SW. Hepatitis C virus genotypes: epidemiological and clinical associations. *Liver* 1998; 18:32-38.
39. Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999; 285:26-30.
40. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG., Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ,

Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962–973.

41. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282:103–107.

42. Lutchman G, Hoofnagle JH. Viral kinetics in hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37: 1257-1259.

43. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, Colby TV, Waleska-Zielecka B, Kubicka J, Wilkinson J, Adair D, Rakela J, Laskus T. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:106-114.

44. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095-2100.

45. Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003; 535: 34–38.

46. Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 2001; 20: 3840–3848.

47. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*. 2003; 77: 5487–5492.

48. Liou TC, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 1992; 37:197-202.

49. Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Lin JT, Chen DS. Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses. *J Med Virol* 1992; 36:28-31.

50. Deforges S, Evtashev A, Perret M, Sodoyer M, Pouzol S, Scoazec JY, Bonnaud B, Diaz O, Paranhos-Baccalà G, Lotteau V, André P. Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells *in vivo*. *J Gen Virol* 2004; 85: 2515–2523.

51. Young KC, Chang TT, Liou TC, Wu HL. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. *J Med Virol* 1993; 41: 55-60.

52. Willems M, Peerlinck K, Moshage H, Deleu I, Van den Eynde C, Vermeylen J, Yap SH. Hepatitis C virus-RNAs in plasma and in peripheral blood mononuclear cells of

hemophiliacs with chronic hepatitis C: evidence for viral replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1994; 42:272-278.

53. Schmidt WN, Klinzman D, LaBrecque DR, Macfarlane DE, Stapleton JT. Direct detection of hepatitis C virus (HCV) RNA from whole blood, and comparison with HCV RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1995; 47:153-160.

54. Ounanian A, Gueddah N, Rolachon A, Thelu MA, Zarski JP, Seigneurin JM. Hepatitis C virus RNA in plasma and blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C treated with alpha-interferon. *J Med Virol* 1995; 45:141-145.

55. Berenguer M, Olaso V, Cordoba J, Gobernado M, Carrasco D, Berenguer J. Genome detection in liver and peripheral blood mononuclear cells: predictor factors of sustained response in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7:899-903.

56. Chang TT, Young KC, Yang YJ, Lei HY, Wu HL. Hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells: comparing acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1996; 23:977-981.

57. Gervais A, Martinot M, Boyer N, Auperin A, Le Breton W, Degott C, Valla D, Marcellin P. Quantitation of hepatic hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. Relationship with severity of the disease, viral genotype and response to treatment. *J Hepatol* 2001; 35: 399-405.

58. Gong GZ, Lai LY, Jiang YF, He Y, Su XS. HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 291-294.

59. Zignego AL, Giannini C, Ferri C. Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders: an overview. *World J Gastroenterol* 2007; 13:2467-2478.

60. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285: 110-113.

61. Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, Penin F, Bartenschlager R. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* 2003; 77: 3007-3019.

62. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11: 791-796.

63. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9294–9299.
64. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309: 623–626.
65. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941.
66. Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *Faseb J* 1997; 11: 428-442.
67. Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 89-109.
68. Wack A, Soldani C, Tseng S, Nuti G, Klimpel S, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 166-175.
69. Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S. Identification of amino acids residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* 2000; 74: 3642-3649.
70. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12766-12771.
71. De Beek A, Dubuisson J. Another putative receptor for hepatitis C virus. *Hepatology* 2003; 37: 705-707.
72. Lohmann V. Processing pathways of the hepatitis C virus proteins. *J Hepatol* 1996; 24: 11-19.
73. Khabar KS and Polyak SJ. Hepatitis C Virus-Host Interactions: The NS5A Protein and the Interferon/Chemokine Systems. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2002; 22: 1005-1012
74. Hadlock KG, Gish R, Rowe J, Rajyaguru SS, Newsom M, Warford A, Fong SK. Cross-reactivity and clinical impact of the antibody response to hepatitis C virus second envelope glycoprotein (E2). *J Med Virol* 2001; 65: 23-29.

75. Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003; 7:89-105.
76. Jacobson Brown PM, Neuman MG. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. *Clin Biochem* 2001; 34: 167-171.
77. Koziel MJ. The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1997; 4 Suppl 2:31-41.
78. Poccia F, Agrati C. Intrahepatic natural immunity and HCV immuno-pathogenesis. *Cell Death Differ* 2003; 10 Suppl 1: S9-S12.
79. Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin Exp Immunol* 2002; 128: 195-203.
80. Lechner F, Wong KH, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; 191: 1499-1512
81. Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25:449-458.
82. Forton, DM, Karayiannis P, Mahmud N, Taylor-Robinson SD & Thomas HC. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol* 2004; 78: 5170–5183.
83. Bigger CB, Guerra B, Brasky KM, Hubbard G, Beard MR, Luxon BA, Lemon SM, Lanford RE. Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J Virol* 2004; 78:13779–13792.
84. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15669–15674.
85. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39: 5–19.
86. Sypniewski D, Jurzak M, Cholewa K, Gola J, Mazurek U, Wilczok T, Ek-kostórkiewicz Justyna Roz, Mazur W, Gonciarz Z. Changes in TNF- α mRNA Levels in the Peripheral Blood of Patients with Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection during α -Interferon and Ribavirin Therapy. *Viral Immunology* 2004; 17:580-587.

87. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Choo QL, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol* 1993; 67:7522-7532.
88. Koziel M. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 157-169.
89. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003; 38:1437-1448.
90. Spengler U, Nattermann J. Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clin Sci (London)* 2007 ;112:141-155
91. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001 19; 194:1395-1406.
92. Quiroga JA, Llorente S, Castillo I, Rodriguez-Inigo E, Lopez-Alcorocho JM, Pardo M, Carreno V. Virus-specific T-cell responses associated with hepatitis C virus (HCV) persistence in the liver after apparent recovery from HCV infection. *J Med Virol* 2006; 78:1190-1197.
93. Quiroga JA, Llorente S, Castillo I, Rodriguez-Inigo E, Pardo M, Carreno V. Cellular immune responses associated with occult hepatitis C virus infection of the liver. *J Virol* 2006;80:10972-10979
94. Dorries R. The role of T-cell-mediated mechanisms in virus infections of the nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001;253:219-245
95. Mihm S, Hartmann H, and Ramadori G. A reevaluation of the association of hepatitis C virus replicative intermediates with peripheral blood cells including granulocytes by a tagged reverse transcription/polymerase chain reaction technique. *J Hepatol* 1996; 24: 491-497.
96. Podevin P, Guechot J, Serfaty L, Monrand-Joubert L, Veyrunes C, Bonnefis MT, Poupon R. Evidence for a deficiency of interferon response in mononuclear cells from hepatitis C viremic patients. *J Hepatol* 1997; 27: 265-271.
97. Pernollet M, Jouvin-Marche E, Leroy V, Vigan I, Zarski JP, Marche PN. Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions. *Clin Exp Immunol* 2002; 130:518-525.
98. Ramadori G and Armbrust T. Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 777-784.

99. Byl B, Roucloux I, Crusiaux A Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1993; 104:1492-1497.
100. Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int* 2006; 26:1029-1039
101. Moretta L. Lymphocyte effector functions. Lymphocyte effector mechanisms in innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17: 303-305
102. Martin MP and Carrington M. Immunogenetics of viral infections. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17:1-7.
103. Mogensen TH and Paludan SR. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65: 131-150.
104. Gershewin ME, Vierling JM, Manns MP. *Liver Immunology*. Hanley & Belfus, Inc. Philadelphia, 2003: 1-29
105. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 116: 241-249 quiz 250.
106. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002; 195: 43-49.
107. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the mayor hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002; 195: 35-41.
108. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2004; 173: 6072-6081.
109. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; 305:872-874.
110. Bowen DG and Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005; 436: 946-952
111. Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach D, Pemberton J, Moorhead-Loudis J, McHutchison JG, Alter HJ, Chisari FV. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; 33:267-276.

112. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65–91.
113. Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999; 162:5584-5591.
114. Gremion C, Cerny A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Rev Med Virol* 2005; 15:235-268.
115. Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo G, Wheeler M, Zou J. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:720-30
116. Hunter CA, and Reiner SL. Cytokines and T cells in host defense. *Current Opinion in Immunology* 2000; 12:413-418.
117. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000; 174:21-34.
118. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343:1467-1476.
119. Orange JS, Salazar-Mather TP, Opal SM, Biron CA. Mechanisms for virus-induced liver disease: tumor necrosis factor-mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection. *J Virol* 1997; 71:9248-9258.
120. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*. 1998; 339:1217-1227.
121. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-2250.
122. Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol* 1992; 263:G579-G585.
123. Yamada Y, Fausto N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol* 1998; 152:1577-1589
124. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996; 274:1379-1383.

125. Fukuma H, Morshed S, Watanabe S, Uchida N, Ezaki T, Minami A, Matsuoka H, Hirabayashi S, Nakatsu T and Nishioka M. Increased expression of cytokines in liver and serum in patients with extrahepatic diseases. *J Gastroenterology* 1996; 31: 538-545.
126. Fan XG, Liu WE, Li CZ, Wang ZC, Luo LX, Tan DM, Hu GL, Zhang Z. Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. *Mediators of inflammation* 1998; 7: 295-297.
127. Fukuda R, Ishimura N, Ishimura S, Chowdhury A, Moriyama N, Nogami C, Miyake T, Niigaki M, Tokuda A, Satoh S, Sakai S, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S. Intrahepatic expression of proinflammatory cytokine mRNA and interferon efficacy in chronic hepatitis C. *Liver* 1996; 16: 390-399.
128. Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, Mc Caughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1 associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24: 759-765.
129. Dumoulin FL, Wennrich U, Nischalke HD, Leifeld L, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U. Intrahepatic mRNA levels of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and response to antiviral treatment of chronic hepatitis C. *J Hum Virol* 2001; 4:195-199.
130. Dumoulin FL, Bach A, Leifeld L, El-Bakri M, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U. Semiquantitative analysis of intrahepatic cytokine mRNAs in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1997; 175:681-685.
131. Fukuda R, Satoh S, Nguyen XT, Uchida Y, Kohge N, Akagi S, Ikeda S, Watanabe M, Fukumoto S. Expression rate of cytokine mRNA in the liver of chronic hepatitis C: comparison with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 1995; 30:41-47.
132. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Iwata K, Yano M, and Yoshioka K. Production of interleukins 10 and 12 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1977; 108:138-143.
133. Kishihara Y, Hayashi J, Yoshimura E, Yamaji K, Nakashima K, Kashiwagi S. IL-1 beta and TNF-alpha produced by peripheral blood mononuclear cells before and during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 315-321.
134. Sarih M, Bouchrit N, Benslimane A. Different cytokines profiles of peripheral blood mononuclear cells from patients with persistent and self limited hepatitis C virus infection. *Immunology Letters* 2000; 74: 117-120.

135. Jia HY, Du J, Zhu SH, Ma YJ, Chen HY, Yang BS, Cai HF. The roles of serum IL-18, IL-10, TNF-alpha and sIL-2R in patients with chronic hepatitis C. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1:378-382.
136. Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W, Wysocki J, Adamek A, Spachacz R, Surdyk-Zasada J. Expression of cytokines (TNF-alpha, IL-1alpha, and IL-2) in chronic hepatitis C: comparative hybridocytochemical and immunocytochemical study in children and adult patients. *J Histochem Cytochem* 2004; 52:29-38
137. Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch D. Elevated levels of Interleukin-8 in serum are associated in Hepatitis C virus infection and resistance to Interferon therapy. *Journal of Virology* 2001; 75: 6209-6211.
138. Schvoerer E, Navas MC, Thumann C, Fuchs A, Meyer N, Habersetzer F, Stoll-Keller F. Production of interleukin-18 and interleukin-12 in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection before antiviral therapy. *J Med Virol* 2003; 70: 588-593
139. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15661–15668.
140. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85: 3173–3188.
141. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 2004; 63: 71–80.
142. Otsuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, Kawabe T, Omata M. Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* 2005; 41: 1004–1012.
143. Gale Jr M, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth M J, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5208–5218.
144. Aizaki H, Saito S, Ogino T, Miyajima N, Harada T, Matsumura Y, Miyamura T, Kohase M. Suppression of interferon-induced antiviral activity in cells expressing hepatitis C virus proteins. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 1111–1120.
145. Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces Interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *Journal of Virology* 2001; 75: 6095-6106.

146. Balasubramanian A, Munshi N, Koziel M J, Hu Zongyi, Liang T J, Groopman J E, Ganju R K. Structural proteins of Hepatitis C virus induce interleukin 8 production and apoptosis in human endothelial cells. *J Gen Virol* 2005; 86: 3291-3301.
147. Taguchi T, Nagano-Fujii M, Akutsu M, Kadoya H, Ohgimoto S, Ishido S, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2,5-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J Gen Virol* 2004; 85: 959-969.
148. Podevin P, Sabile A, Gajardo R, Delhem N, Abadie A, Lozach PY, Beretta L, Brechot C. Expression of hepatitis C virus NS5A natural mutants in a hepatocytic cell line inhibits the antiviral effect of interferon in a PKR-independent manner. *Hepatology* 2001; 33: 1503-1511.
149. Han JQ, Barton DJ. Activation and evasion of the antiviral 2-5 oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA* 2002; 8: 512-525.
150. Meier UC, Owen RE, Taylor E, Worth A, Naoumov N, Willberg C, Tang K, Newton P, Pellegrino P, Williams I, Klenerman P, Borrow P. Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J Virol* 2005; 79:12365-12374.
151. Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 2006; 130:435-452.
152. McKiernan SM, Hagan R, Curry M, McDonald GS, Kelly A, Nolan N, Walsh A, Hegarty J, Lawlor E, Kelleher D. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 2004; 40: 108-114.
153. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine: 1998 update. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 28: 48-59.
154. Shi Q, Chen K, Morris-Natschke SL, Lee KH. Recent progress in the development of tubulin inhibitors as antimitotic antitumor agents. *Curr Pharm Des* 1998; 4: 219-248.
155. Arrieta O, Rodriguez-Diaz JL, Rosas-Camargo V, Morales-Espinosa D, Ponce de Leon S, Kershenobich D, Leon-Rodriguez E. Colchicine delays the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis virus-related liver cirrhosis. *Cancer* 2006; 107:1852-1858.

156. Harris ED, Krane SM. Effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1971; 14: 669-684.
157. Rodjkind M, Kershenovich D. Effect of colchicine on collagen, albumin, and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Biochim Biophys Acta* 1975; 378: 415-423.
158. Rockey DC. New therapies in hepatitis C virus and chronic liver disease: antifibrotics. *Clin Liver Dis* 2006; 10:881-900.
159. Rockey DC. Antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:95-107
160. Nikolaidis N, Kountouras J, Giouleme O, Tzarou V, Chatzizisi O, Patsiaoura K, Papageorgiou A, Leontsini M, Eugenidis N, Zamboulis C. Colchicine treatment of liver fibrosis. *Hepatology* 2006; 53:281-285.
161. Erlich HP, Bornstein P. Microtubules intracellular movement of procollagen. *Nature New Biol* 1972; 238: 257-260.
162. Kershenovich D, Vargas F, Garcia-Tsao G, Perez Tamayo R, Gent M, Rojkind M. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N Engl J Med* 1988; 318: 1709-1713.
163. Akriviadis EA, Steindel H, Pinto PC, Fong TL, Kanel G, Reynolds TB, Gupta S. Failure of colchicine to improve short- term survival in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1990; 99: 811-818.
164. Rambaldi A, Gluud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis. *Liver* 2001; 21: 129-136.
165. Morgan TR, Weiss DG, Nemchausky B, Schiff ER, Anand B, Simon F, Kidao J, Cecil B, Mendenhall CL, Nelson D, Lieber C, Pedrosa M, Jeffers L, Bloor J, Lumeng L, Marsano L, McClain C, Mishra G, Myers B, Leo M, Ponomarenko Y, Taylor D, Chedid A, French S, Kanel G, Murray N, Pinto P, Fong TL, Sather MR. Colchicine treatment of alcoholic cirrhosis: a randomized, placebo-controlled clinical trial of patient survival. *Gastroenterology* 2005; 128:882-890.
166. Rambaldi A, Gluud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis and cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 2: CD002148.
167. Zhang FK, Zhang JY, Jia JD. Treatment of patients with alcoholic liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005; 4:12-17.
168. Muriel P, Moreno MG, Hernandez Mdel C, Chavez E, Alcantar LK. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl4 administration in the rat after discontinuation of treatment:

effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96:375-380.

169. Kershenobich D, Rojkind M, Quiroga A, Alcocer-Varela J. Effect of colchicine on lymphocyte and monocyte function and its relation to fibroblast proliferation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990; 11:205-209.

170. Oo YH, Neuberger J. Options for treatment of primary biliary cirrhosis. *Drugs* 2004; 64:2261-2271.

171. Brancatelli G., Federle MP, Blachar A, Gong Y, Christensen E, Glud C, Roblin X, Bonaz B, Kaplan MM, Gershwin ME. Primary Biliary Cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353:2719-2720.

172. Kaplan M. The use of methotrexate, colchicine, and other immunomodulatory drug in the treatment of primary biliary cirrhosis: A national survey. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:817-820.

173. Vuoristo M, Farkkila M, Karnoven AL, Leino R, Lehtola J, Mäkinen J, Mattila J, Friman C, Seppälä K, Tuominen J. A placebo-controlled trial of primary biliary cirrhosis treatment with colchicine and ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 1995; 108: 1470-1478.

174. Kaplan MM, Alling DW, Zimmerman HJ, Wolfe HJ, Sepersky RA, Hirsch GS, Elta GH, Glick KA, Eagen KA. A prospective trial of colchicine for primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1986; 315: 1448-1454.

175. Vela S, Agrawal D, Khurana S, Singh P. Colchicine for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis of prospective controlled trials. *Gastroenterology* 2004; 126: A671-A672.

176. Kaplan MM, Gershwin E. Primary Biliary Cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 1261-1273.

177. Gong Y, Glud C. Colchicine for primary biliary cirrhosis: A Cochrane hepatobiliary group systematic review of randomized clinical trials. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1876-1885.

178. Diago M. Does antiviral therapy improve the clinical course of cirrhosis due to hepatitis C virus infection? *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30:85-92.

179. Moradpour D, FALK Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol* 2004; 17: 498-515.

180. Pestka S, Langer JA. Interferons and their actions. *Ann Rev biochem* 1987; 56:727-777.

181. Sen GC, Lengyel P. The interferon system. A bird's eye view of this biochemistry. *J Biol Chem* 1992; 267:5017-5020.
182. Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol* 2004; 17: 498–515.
183. Katze MG, He Y, Gale Jr. M. Viruses and interferon: A fight for supremacy. *Nat Rev Imm* 2002; 2: 675-687.
184. Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, Noguchi O, Nishimura Y, Inoue K, Ueda K, Tsuchiya K, Hamano K, Itakura J, Miyake S. Interferon-stimulated gene expression and hepatitis C viral dynamics during different interferon regimens. *J Hepatol* 2003; 39: 421-427.
185. Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chapgier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghonaium A, Tufenkeji H, Frayha H, Algazlan S, Al-Rayes H, Schreiber RD, Gresser I, Casanova JL. Impaired response to interferon α /beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 2003; 33: 388–391.
186. Kido M, Kumagai N, Toda K, Tsuchimoto K, Komiyama T. Differential induction of serum interleukin-6 and -12 by interferon-alpha and -beta administration in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2003; 27:101-108.
187. Frese M, Schwärzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Otto Haller, Bartenschlager R. Interferon- γ inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002; 35: 694-703.
188. Mandell GL. Cytokines, phagocytes, and pentoxifylline. *J Cardiovascular Pharmacology* 1995; 25 (suppl 2): S20-S22.
189. Adams LA, Zein CO, Angulo P, Lindor KD. A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis *Am J Gastroenterol* 2004; 99:2365-2368.
190. Koppe SW, Sahai A, Malladi P, Whittington PF, Green RM. Pentoxifylline attenuates steatohepatitis induced by the methionine choline deficient diet. *J Hepatol* 2004; 41:592-598.
191. Satapathy SK, Garg S, Chauhan R, and etal. Beneficial effects of tumor necrosis factor α inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:1946-1952.

192. Lazarczyk M, Grzela T, Niderla J, Dziunycz P, Milewski L, Lazarczyk MA, Samaba R. Influence of pentoxifylline on perforin expression in human PBMC. *Int J Mol Med* 2004; 14:725-728.
193. Prandota J. Important role of proinflammatory cytokines/other endogenous substances in drug-induced hepatotoxicity: depression of drug metabolism during infections/inflammation states, and genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes/cytokines may markedly contribute to this pathology. *Am J Ther* 2005; 12:254-261.
194. Coimbra R, Loomis W, Melbostad H, Tobar M, Porcides RD, Hoyt DB. LPS-Stimulated PMN Activation and Proinflammatory Mediator Synthesis is Downregulated by Phosphodiesterase Inhibition: Role of Pentoxifylline. *J Trauma* 2004; 57:1157-1163.
195. Whitehouse MW. AntiTNF-alpha therapy for chronic inflammation: reconsidering pentoxifylline as an alternative to therapeutic protein drugs. *Inflammopharmacology* 2004; 12:223-227.
196. Hernandez E, Correa A, Bucio L, Souza V, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC. Pentoxifylline diminished acetaldehyde-induced collagen production in hepatic stellate cells by decreasing interleukin-6 expression. *Pharmacol Res* 2002; 46:435-443.
197. Austin AS, Mahida YR, Clarke D, Ryder SD, Freeman JG. A pilot study to investigate the use of oxpentifylline (pentoxifylline) and thalidomide in portal hypertension secondary to alcoholic cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19:79-88.
198. Desmouliere A, Xu G, Costa AM, Yousef IM, Gabbiani G, Tuchweber B. Effect of pentoxifylline on early proliferation and phenotypic modulation of fibrogenic cells in two rat models of liver fibrosis and on cultured hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999; 30:621-631.
199. Lee KS, Cottam HB, Houglum K, Wasson DB, Carson D, Chojkier M. Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitory activity. *Am J Physiol* 1997; 27:G1094-G1100.
200. Agarwal K, Kontorinis N, Dieterich DT. Alcoholic Hepatitis. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2004; 7:451-458.
201. Levitsky J, Mailliard ME. Diagnosis and therapy of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 2004; 24:233-247.
202. Haber PS, Warner R, Seth D, Gorrell MD, McCaughan GW. Pathogenesis and management of alcoholic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18:1332-1344.

203. Coimbra R, Porcides RD, Melbostad H, Loomis W, Tobar M, Hoyt DB, Wolf P. Nonspecific phosphodiesterase inhibition attenuates liver injury in acute endotoxemia. *Surg Infect (Larchmt)* 2005; 6:73-85.
204. Ji Q, Zhang L, Jia H, Xu J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34:427-436.
205. Tilg H, Eibl B, Pichl M, Gachter A, Herold M, Brankova J, Huber C, Niederwieser D. Immune response modulation by pentoxifylline in vitro. *Transplantation*. 1993; 56:196-201.
206. Rieneck K, Diamant M, Haahr PM, Schonharting M, Bendtzen K. In vitro immunomodulatory effects of pentoxifylline. *Immunol Lett* 1993; 37:131-138
207. Neuner P, Klosner G, Schauer E, et-al. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-6, IL-8 and Tumor Necrosis Factor Alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 1994; 83:262-267.
208. D'Hellencourt CL, Diaw L, Cornillet P, Guenounou M Differential regulation of TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNF beta, and IL-10 by pentoxifylline. *Int J Immunopharmacol*. 1996; 18:739-748.
209. Noel P, Nelson S, Bokuhe R. Pentoxifylline inhibits lipopolisaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality. *Life Science* 1990; 47:1023-1029.
210. Peterson TC. Pentoxifylline prevents fibrosis in an animal model and inhibits Platelet Derived Growth Factor driven proliferation of fibroblast. *Hepatology* 1993; 17:486-493.
211. Zabel P, Schonharting MM, Wolter DT. Oxopentoxifylline inhibits lipopolisaccharide-induced serum Tumor Necrosis Factor and mortality. *Life Science* 1990; 47:1023-1029.
212. Rood WK, DeGowm. Expressive effects of pentoxifylline on natural killer cell activity. *J Lab Clin Med* 1992; 119:763-771
213. Raetsch C, Jia J D, Boigk G, Bauer M, Hahn E G, Riecken E-O, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002; 50:241-247.
214. Windmeier C, Gressner AM. Effect of pentoxifylline on the fibrogenic functions of cultured rat liver fat-storing cells and myofibroblasts. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:577-584.

215. Windmeier C, Gressner AM. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. *Gen Pharmacol* 1997; 29:181-196.
216. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol. *Anal. Biochem.* 1987; 162:156-159.
217. Legoux P, Minty C, Delpech B, Minty AJ, Shire D. Simultaneous quantitation of cytokine mRNAs in interleukin-1 beta stimulated U373 human astrocytoma cells by a polymerization chain reaction method involving co-amplification with an internal multi-specific control. *Eur Cytokine Net* 1992; 3:552-563.
218. Shire D. An invitation to an open exchange of reagents and information useful for the measurement of cytokines mRNA levels by PCR. *Eur cytokine Netw* 1993; 4:161-162.
219. Spengler U. Immune responses in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1996;24(2 Suppl):20-25
220. Lechmann M. Decreased frequency of HCV core-specific peripheral blood mononuclear cells with type 1 cytokine secretion in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31:971-978
221. Marinho RT, Pinto R, Santos ML, Lobos IV, Moura MC. Effects of interferon and ribavirin combination therapy on CD4+ proliferation, lymphocyte activation, and Th1 and Th2 cytokine profiles in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004; 11: 206-216.
222. Cacere A. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response and to different cytokine profile. *Panminerva Med* 2004; 46:171-187.
223. Lohr HF, Gerken G, Roth M, Weyer S, Schlaak JF, Meyer zum Buschenfelde KH. The cellular immune responses induced in the follow-up of interferon-alpha treated patients with chronic hepatitis C may determine the therapy outcome. *J Hepatol* 1998;29:524-532.
224. Sobue S, Nomura T, Ishikawa T, Ito S, Saso K, Ohara H, Joh T, Itoh M, Kakumu S. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2001; 36:544-551.
225. Gramenzi A, Andreone P, Loggi E, Foschi FG, Cursaro C, Margotti M, Biselli M, Bernardi M. Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2005; 12:525-530.
226. Nelson DR The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 931-953.

227. Shapiro S, Gershtein V, Elias N, Zuckerman E, Salman N, Lahat N. mRNA cytokine profile in peripheral blood cells from chronic hepatitis C virus (HCV)-infected patients: effects of interferon-alpha (IFN-alpha) treatment. *Clin Exp Immunol* 1998; 114:55-60.
228. Woitas RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, Spengler U. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:562-566.
229. Sherman K and Sherman S. Interferon plus thymosin α -1 treatment of chronic hepatitis C infection: a meta-analysis. *Therapies for Viral Hepatitis 1998*. Edited by RF Schinazi, J-P Sommadossi and HC Thomas.
230. Piazzolla G, Tortorella C, Schiraldi O, Antonaci S. Relationship between interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 production in chronic hepatitis C and in vitro effects of interferon-alpha. *J Clin Immunol* 2000; 20:54-61.
231. Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, Omata M. Hepatitis C virus core protein activates nuclear factor kappa B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *J Biol Chem* 2001; 276:16399-16405.
232. Zhu H and Liu C. Interleukin-1 inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by activation of extracellular regulated kinase pathway. *Virology* 2003; 77:5493-5498.
233. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163: 6236-6243.
234. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New Engl J Med* 2006; 354: 610-621.
235. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin 8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55: 97-179.
236. Khabar KS, Al Zoghaibi F, Murayama T, Matsushima K, Mukaida N, Siddiqui Y, et al. Interleukin 8 selectively enhances cytopathic effect (CPE) induced by positive-strand RNA viruses in the human WISH cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235: 774-778.
237. Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core in the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000; 32: 405-412.

238. Balasubramanian A, Ganju RK, Groopman JE. Hepatitis C virus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin-8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 35755-35766.
239. Radkowski M, Bednarska A, Horban A, Stanczak J, Wilkinson J, Adair DM, Nowicki M, Rakela J, Laskus T. Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8. *J Gen Virol* 2004; 85:47-59
240. Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T, Casola A, Brasier A, Khabar KS, Wakita T, Gale M Jr, Polyak SJ. Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection: *J Virol* 2007; 81:309-318.
241. Shimoda K, Begum NA, Shibuta K, Mori M, Bonkovsky HL, Banner BF, Barnard GF. Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28:108-115.
242. Mihm U, Hermann E, Sarrazin U, von Wagner M, Kronenberger B, Zeuzem S, Sarrazin C. Association of serum interleukin-8 with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2004; 40: 845-852.
243. Chuang E, Del Vecchio A, Smolinski S, Song XY, Sarisky RT. Biomedicines to reduce inflammation but not viral load in chronic HCV--what's the sense? *Trends Biotechnol* 2004; 22: 517-523.
244. Dumoulin FL, Leifeld L, Honecker U, Sauerbrunn T, Spengler U. Intrahepatic expression of interleukin-1b and tumor necrosis factor-alpha in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1999; 180:1704-1708.
245. Kaplanski G, Farnarier C, Payan MJ, Bongrand P, Durand JM. Increased levels of soluble adhesion molecules in the serum of patients with hepatitis C. Correlation with cytokine concentrations and liver inflammation and fibrosis. *Dig Dis Sci* 1997; 42:2277-2284.
246. Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts). *Clin Ter* 2006; 157:377-386.
247. Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (2 of 2 parts). *Clin Ter*. 2006; 157:457-468.

248. Girard S, Shalhoub P, Lescure P, Sabile A, Misek DE, Hanash S, et al. An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin-8 induced by hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis. *Virology* 2002; 295: 272-283.
249. Khabar KS, Al-Hai L, Al-Zoghaibi F, and et al. Expressed gene clusters associated with cellular sensitivity and resistance towards anti-viral and anti-proliferative actions of interferon. *J Mol Biol* 2004; 342:833-846.
250. Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:23-38
251. Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24:439-454.
252. Smith GL. Virus proteins that bind cytokines, chemokines or interferons. *Curr Opinion Immunol* 1996; 8:467-471.
253. Neuman MG, Benhamou JP, Bourliere M, Ibrahim A, Malkiewicz I, Asselah T, Martinot-Peignoux M, Shear NH, Katz GG, Akremi R, Benali S, Boyer N, Lecomte L, Le Breton V, Le Guludec G, Marcellin P. Serum tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. *Cytokine* 2002; 17: 108-117.
254. Alvarado Esquivel C, Elewaut A, Philippe J, Elewaut AE, Desombere I, Maertens G, Leroux-Roels. Evolution of hepatitis C virus-specific T cell responses and cytokine production in chronic hepatitis C patients treated with high doses of interferon-alpha. *Rev Invest Clin.* 2002; 54:41-50.
255. Polyak SJ. Hepatitis C virus-cell interactions and their role in pathogenesis. *Clin Liver Dis* 2003; 7:67-88.
256. Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, and et al. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:13618-13623.
257. Napoli J, Bishop GA, McCaughan GW. Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukins 2, 6, and 8 in human cirrhosis. *Gastroenterology.* 1994; 107:789-798.
258. Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechanism of liver fibrogenesis: a homage to the role of activated fat storing cells. *Digestion* 1995; 56: 335-346.
259. Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxifylline Improves Short-term Survival in Severe Acute Alcoholic Hepatitis: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Gastroenterology* 2000; 119:1637-1648.

260. Lieber CS. New concepts of the pathogenesis of alcoholic liver disease lead to novel treatments. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 60-65.
261. Wanchu A, Bhatnagar A, Bamberg P, Singh S, Varma S. Prevention of opportunistic infections in HIV infection by pentoxiphylline. *Indian J Med Res.* 2006; 124:705-708
262. Zylberberg H, Rimaniol AC, Pol S, Masson A, De Groote D, Berthelot P, Bach JF, Bréchet C, Zavala F. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol* 1999; 30:185-191.
263. Zhang P, Chen Z, Chen F, Li MW, Fan J, Zhou HM, Liu JH, Huang Z. Expression of IFN-gamma and its receptor alpha in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis C. *Chin Med J(Engl)* 2004;117:79-82.
264. Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology* 1996; 24:6-9.
265. Iwata K, Wakita T, Okumura A, Yoshioka K, Takayanagi M, Wands JR, Kakumu S. Interferon gamma production by peripheral blood lymphocytes to hepatitis C virus core protein in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 1995; 22 (4 Pt 1):1057-1064.
266. Neuman MG, Benhamou JP, Marcellin P, Valla D, Malkiewicz IM, Katz GG, Trepo C, Bourliere M, Cameron RG, Cohen L, Morgan M, Schmilovitz-Weiss H, Ben-Ari Z. Cytokine--chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis C. *Transl Res.* 2007; 149:126-136
267. Piazzolla G, Tortorella C, Fiore G, Fanelli M, Pisconti A, Antonaci S. Interleukin-12 p40/p70 ratio and in vivo responsiveness to IFN-alpha treatment in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:453-461
268. Hempel G, Galle PR, Lohr HF. Quantitative analysis of specific Th1/Th2 helper cell responses and IgG subtype antibodies in interferon-alpha-treated patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2001; 64:340-349.
269. Bozkaya H, Bozdayi AM, Aslan N, Türkay C, Sarioglu M, Cetinkaya H, Akdogan M, Cinar K, Erden E, Köse K, Sentürk H, Akkiz H, Karayalcin S, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O. Circulating IL-2 and IL-10 in chronic active hepatitis C with respect to the response to IFN treatment. *Infection* 2000; 28:309-313.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

Effect of Pentoxifylline on Levels of Pro-inflammatory Cytokines During Chronic Hepatitis C

G. Gutierrez-Reyes*, P. Lopez-Ortal†, S. Sixtos†, S. Cruz†, M. T. Ramirez-Iglesias†, M. C. Gutierrez-Ruiz‡, F. Sanchez-Avila†, E. Roldan†, F. Vargas-Vorackova† & D. Kershenobich*

*Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, †Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan; and ‡Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

Received 12 January 2006; Accepted in revised form 21 March 2006

Correspondence to: Dr D. Kershenobich, Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, UNAM, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Mexico City, DF 06726, Mexico. E-mail: kesdhipa@sar.net

Abstract

The cellular and humoral natural immune response induced by hepatitis C virus (HCV) is commonly unable to eradicate the virus. HCV is a highly mutable, hepatotropic RNA virus that causes acute and chronic hepatitis, an infection that involves the production of various cytokines. The aim of the study is to analyse the expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and the chemokine CXCL8 (IL-8) in liver tissue and their expression and secretion in PBMC of patients with chronic hepatitis C (CHC), in response to pentoxifylline (PTX). We studied six CHC patients, naive to treatment. Patients received PTX 400 mg twice a day/8 weeks. Pentoxifylline resulted in decreased expression of mRNA of liver IL-1 β , TNF- α and IFN- γ : 144.2 versus 83.5 molecules of IL-1 β ($P < 0.05$), TNF- α 194.3 versus 17.6 molecules ($P = 0.03$) and IFN- γ 26.1 versus 0.5 molecules ($P = 0.04$). Following PTX, PBMC exhibited a decrease in IFN- γ mRNA 12.2 versus 1.5 molecules ($P = 0.028$) and CXCL8 4.2 versus 2.5 molecules ($P = 0.027$). In PBMC, only the secretion of TNF- α was decreased 1109 versus 933.5 pg/ml, $P = 0.046$. Production of cytokines both locally (within the liver) and systemically (PBMC) may serve as biomarkers of the infection with hepatitis C. PTX inhibits the expression of several pro-inflammatory cytokines in the liver. These results indicate that it is worth exploring PTX in hepatitis in future clinical trials in nonresponders to antiviral treatment.

Introduction

The hepatitis C virus (HCV) represents an established persistent infection. It is estimated that approximately 170 million people (3% of the world's population) [1–4] are chronically infected with HCV. Chronic hepatitis C (CHC) is often silent, and a significant number of persistently infected individuals remain unaware of infection for even decades, often leading to scar formation, fibrosis and finally cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma [5–8]. The cellular and humoral natural immune responses are unable to eradicate HCV infection in most patients [9–12], yet sufficient to sustain a low-grade liver inflammation [13–15]. HCV is a highly mutable, hepatotropic RNA virus that causes acute and chronic hepatitis, an infection resulting in the induction of pro-inflammatory cytokines, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity, followed by liver injury [16]. Several studies have shown that different cytokines are potentially involved in HCV-induced liver damage [17–20]. The liver is a source of many cytokines that may influence liver function. Among

the cytokines, increased intrahepatic expression of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) α and β , IL-2, IL-6 and IL-8 has been observed in CHC patients [21–24]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) also produce many different cytokines that are potentially involved in HCV-induced liver damage. PBMC are thought to have a role in viral persistence and clinical outcome, as these infected cells can serve as a viral reservoir [25, 26] and may become an extrahepatic peripheral viral replication source. Infected PBMC may be involved in the selection and persistence of HCV genomic variants.

Pentoxifylline (PTX), a nonspecific phosphodiesterase inhibitor, with combined anti-inflammatory and antifibrogenic properties, has been shown to be useful in different models *in vitro* and *in vivo* of liver disease such as non-alcoholic steatohepatitis [27–29], inflammation [30–33], fibrosis/cirrhosis [34–37], alcoholic liver disease [38–40] and endotoxaemia [41]. The beneficial effects occur through mechanisms such as inhibition of phosphodiesterases, increased AMPc levels and downregulation of

TNF- α , IL-1, IL-6, transforming growth factor-beta (TGF- β), interferon-gamma (IFN- γ) and downregulation of stellate cell activation and procollagen I mRNA expression [42]. It also has inhibitory effects on basic mechanisms of fibrogenesis such as cell proliferation and extracellular matrix (ECM) synthesis [43].

In the present study, we studied the expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and the chemokine CXCL8 in the liver and in PBMC of patients with chronic hepatitis C, before and after the administration of PTX.

Materials and methods

Patients. We studied six patients with clinical and histological diagnosis of chronic hepatitis C. All were HCV-RNA (+), HBsAg (-) and HIV (-), quantitative HCV-RNA ranged from 23,000 to >800,000 UI/ml; none had a history of alcohol abuse, concomitant systemic diseases or autoimmunity. All were naive to antiviral or immunomodulatory treatment and did not comply with entry criteria for IFN- α plus ribavirin (institutional-based protocol treatments). After signing informed consent, the patients received 400 mg of PTX twice a day for 8 weeks.

Blood samples were taken at pretreatment (0 week) and 8 weeks of treatment for culture of PBMC, cytokine expression/secretion and biochemical assays of each one of patients. A basal liver biopsy at the time of entering the study and after 8 weeks of PTX was obtained and graded using the Metavir score [44] and analysed for cytokine mRNA expression.

Viral load was quantified by Cobas Amplicor (Roche, Indianapolis, IN, USA), and liver function tests were quantified by enzymatic and spectrophotometric methods (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Liver biopsy specimens. The liver tissues were obtained by percutaneous biopsies with a Tru-Cut needle guided by ultrasound or laparoscopy. Tissues were stained with haematoxylin and Mason techniques. Cytokine expression was determined by quantification of the corresponding mRNA as described by Legoux *et al.* [45].

Peripheral blood mononuclear cells. PBMC were separated by standard density gradient centrifugation (Ficoll-Hypaque) and adjusted to 1×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% foetal bovine serum. Cells (10^6 /ml) were cultured for 24 h. Supernatants were collected, centrifuged to remove cells and stored at -70°C until use for cytokine assays. Cells were lysed in trizol (Gibco, BRL, UK) and stored at -70°C until total RNA preparation.

Preparation of RNA and PCR amplification of cDNA. Total RNA from hepatic tissue and PBMC were isolated with trizol according to manufacturer's instructions. The RNA was treated with 10 units of RNase-free DNase (Gibco, BRL) at 37°C for 30 min, then extracted with phenol and chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v) and precipitated with ethanol. Total RNA was then quantified

by measuring the optical density at 260 nm with a Beckman spectrophotometer. With RT-PCR involving co-amplification with an internal multispecific control, the cDNA was prepared from total cellular RNA using oligo [d(T)₁₆₋₁₈] and reverse transcriptase (RT) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). cDNA was then amplified using PCR-specific primers for each cytokine gene and Ampli-Taq DNA polymerase as described [45]. A 15 μl aliquot of each amplified product was run by electrophoresis through a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide to ensure the correct size of the amplicon product. Gels were observed, and densitometric analysis was performed with the EDAS (Kodak, Rochester, NY) system. The amplicons were determined by fluorescence.

Cytokine quantification. mRNA expression: Cytokine mRNA was measured in liver tissue and PBMC, using a known amount of standard RNA produced from plasmid pQA-1, which contains a tandem array of primers for β_2 -microglobulin, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and CXCL8 (IL-8) that was added to 1 ng of cellular RNA before production of cDNA [45]. Standardization was obtained for β_2 -microglobulin and for each of the cytokines tested (Fig. 1). The results were expressed as number of mRNA molecules per 10^5 molecules of β_2 -microglobulin.

Cytokine secretion. IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and CXCL8 (IL-8) secreted proteins were determined in PBMC culture media using enzyme-linked immunosorbent assays

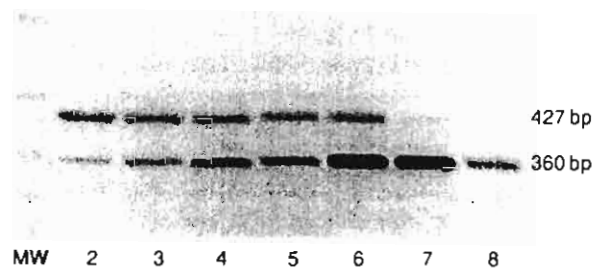


Figure 1 Quantification procedure taking an example of the co-amplification of the cDNA from liver RNA and from standard RNA for pQA-1 plasmid for TNF- α . Amplified pairs products were electrophoresed through a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The gel was photographed with EDAS (Kodak) system. The figure shows the 360-bp band that represents the amplicons obtained with standard cDNA and the 427-bp products by the liver cDNA. All lanes contained 1 ng of total liver RNA with 0.0075, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 and 0.05 μg of standard RNA from lane 2-7, respectively, and in lane 8, 0.01 μg of standard RNA alone. From each pair of bands, the relative intensity of liver amplicon/standard amplicon was calculated. The ratio between liver amplicon and standard amplicon was 0.45, 0.72, 1.1, 1.66 and 2.5, lanes 2-6. In lane number 4, the ratio between liver amplicon/standard amplicon allowed comparison of the known amount of standard cRNA to the unknown amount of mRNA for TNF- α . Each cytokine quantification was performed with at least three plasmid concentrations. The number of molecules of mRNA of total RNA was calculated using the molecular weight of the plasmid and Avogadro's number.

(ELISA) (Quantikine human, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Statistical analyses. The data, expressed as median interval, were analysed by the Friedman test. Correlation between cytokine secretion and expression was assessed by Spearman correlation index. Differences were compared by the nonparametric Wilcoxon's test and Spearman correlation. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data were analysed using the *SPSS* statistical package version 11 for Windows.

Results

The six patients were female, ranging in age from 20 to 61 years (mean 46.8 years). The average duration of the HCV infection had been 20 ± 5 years. Clinical and relevant data from patients are shown in Table 1. All patients were virus genotype 1 and had a liver fibrosis score F1-F2 according to the Metavir classification. None of them had a greater than 2 log drop in the HCV load or significant changes in the Metavir score 8 weeks following PTX administration. Histological analyses showed a paucity of inflammation in all patients (data not shown).

Serum ALT values decreased after 8 weeks of treatment in 5/6 patients (104 ± 17 versus 75 ± 14 UI/ml, $P = 0.026$) (Table 1).

In all samples of liver biopsy and PBMC from HCV-infected patients, mRNA of $\beta 2$ -microglobulin was demonstrated, thus indicating the integrity of the RNA and the quantification of studied genes. Administration of PTX for 8 weeks induced a significant decrease in the gene expression of IL-1 β mRNA in liver tissue: 144.2 (range: 53.3–334.4) versus 83.5 [range: from not detectable (ND) to 227.7] molecules of IL-1 β /10⁵ molecules of $\beta 2$ -microglobulin ($P < 0.05$, Fig. 2A), changes in TNF- α : 194.3 (range: 128–798) versus 17.6 (range: 3–50) molecules of TNF- α /10⁵ molecules of $\beta 2$ -microglobulin ($P = 0.03$, Fig. 2B) and IFN- γ : 26.1 (range: 4–65.2) versus 0.5 (range: from ND to 23.7) molecules of IFN- γ /10⁵ molecules of $\beta 2$ -microglobulin ($P = 0.04$, Fig. 2C).

We did not observe a significant difference in the expression of CXCL8 mRNA after 8 weeks of treatment (Fig. 2D).

Subsequent to PTX, the cytokine expression profile in PBMC cultures showed a decrease in IFN- γ mRNA: 12.2 (range: 4–35.1) versus 1.5 (range: 0.7–4.3) molecules of IFN- γ /10⁵ molecule of $\beta 2$ -microglobulin ($P = 0.028$) and CXCL8 mRNA: 4.2 (range: 4–12.6) versus 2.5 (range: 0.4–2.9) molecules of CXCL8/10⁵ molecule of $\beta 2$ -microglobulin ($P = 0.027$) (Fig. 3C,D). IL-1 β and TNF- α mRNA expression remained unaltered in PBMC after 8 weeks of PTX administration (Fig. 3A,B).

We also observed a decrease in the only cytokine secretion by PBMC of TNF- α : 1109 (range: 911–1208) versus 933.5 (range: 687–1055) pg/ml ($P = 0.046$) (Fig. 4B), while no significant difference was observed in the secretion of protein of IL-1 β (Fig. 4A), IFN- γ (Fig. 4C) or CXCL8 (Fig. 4D).

Discussion

We have studied the expression of several cytokines in hepatitis C patients receiving PTX. As the pharmacokinetics and metabolism of PTX have not been thoroughly studied in patients with hepatic dysfunction and in order to avoid any possible side effects, we used dose of PTX of 400 mg twice a day. Our data indicate that PTX at this dose has an effect on the expression of several pro-inflammatory cytokines in both liver tissue and PBMC of patients with hepatitis C. The effect of PTX, in particular on TNF- α and IL-1 β production, is similar to the results previously reported in other clinical studies with agents such as AIDS or alcoholic liver disease [37, 38]. TNF- α and IL-1 β have been recognized as key regulatory cytokines in liver damage [21, 22]. TNF- α can directly control viral infection [19, 20, 46] and is required for normal proliferation of hepatocytes in liver regeneration. TNF- α is known as a mediator of hepatocyte death [47]. Furthermore, during HCV infection, it has been shown that TNF- α serum levels correlate with the severity of liver

Table 1 Clinical, histological, biochemical and viral load data of chronic hepatitis C patients

Patient	Age	Sex	Genotype	Metavir		ALT (UI/ml)		HCV-RNA (UI/ml)	
				Basal	8 weeks	Basal	8 weeks	Basal	8 weeks
1	50	F	1b	F1	F2	172	109	407,000	>800,000
2	51	F	1a	F2	F1	67	48	114,800	72,800
3	58	F	1b	F2	F2	84	59	>800,000	>800,000
4	61	F	1b	F1	F2	60	48	565,600	92,400
5	20	F	1a	F1	F2	119	60	102,800	90,260
6	41	F	1b	F2	F2	122	128	23,000	23,000

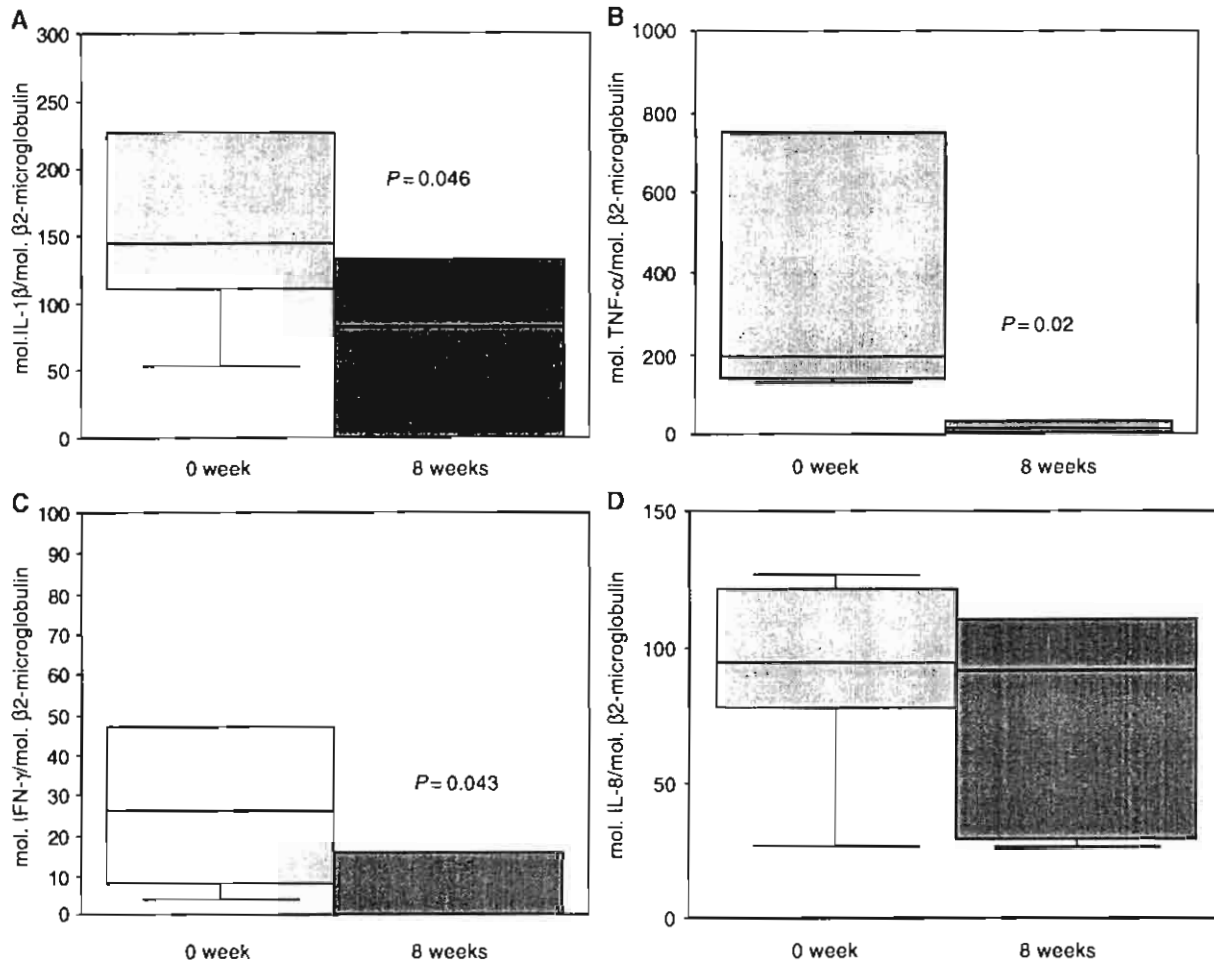


Figure 2 Cytokine mRNA expression in liver biopsies from six hepatitis C patients during the course of PTX administration: (A) IL-1β; (B) TNF-α; (C) IFN-γ and (D) CXCL8 (IL-8) at pretreatment (0 week) and at 8 weeks. The results are shown as molecules of cytokine/10⁵ molecules of β₂-microglobulin.

necroinflammation. Interestingly, in the biopsy obtained after 2 months of PTX treatment, we observed in each patient a paucity in inflammation (data not shown). IL-1β and IFN-γ participate in the induction of acute-phase responses and autoactivation of Kupffer cells and are known to stimulate the production of matrix metalloproteinases, to inhibit collagen synthesis, and to interfere with matrix formation, rendering the liver vulnerable to further damage [22, 23, 48, 49]. Both TNF-α and IL-1β induce other cytokines and chemokines that can upregulate adhesion molecules, induce cell activation and recruit and enhance cytotoxicity of lymphocytes, macrophages and neutrophils [19, 21], all of which participate in the pathogenesis of hepatitis C. Our data also indicate that PTX downregulates the expression of IFN-γ mRNA in the liver. IFN-γ is a multi-functional protein that can induce a large number of

genes which mediate many biological processes including host defence, signalling and cell growth control [50]. High levels of CXCL8 mRNA were found before the administration of PTX. Upregulation of CXCL8 suggests that this chemokine may play a role in the pathogenesis of hepatitis C.

An interesting finding in our study is the observation that PTX decreased CXCL8 and IFN-γ mRNA expression and TNF-α secretion in PBMC of the patients with CHC. CXCL8 is a CXC chemokine released by Kupffer cells that attracts various leucocytes to infection sites, including neutrophils, T lymphocytes and basophils. CXCL8 expression is induced primarily in fibroblasts and epithelial cells by IL-1 and TNF-α [50–52]. On the other hand, IFN-γ inhibits virus replication in infected cells and stimulates antigen presentation by inducing class II MHC expression [46, 53]. Measurement of cytokines at different sites such as peripheral blood cells versus liver tissue may lead to

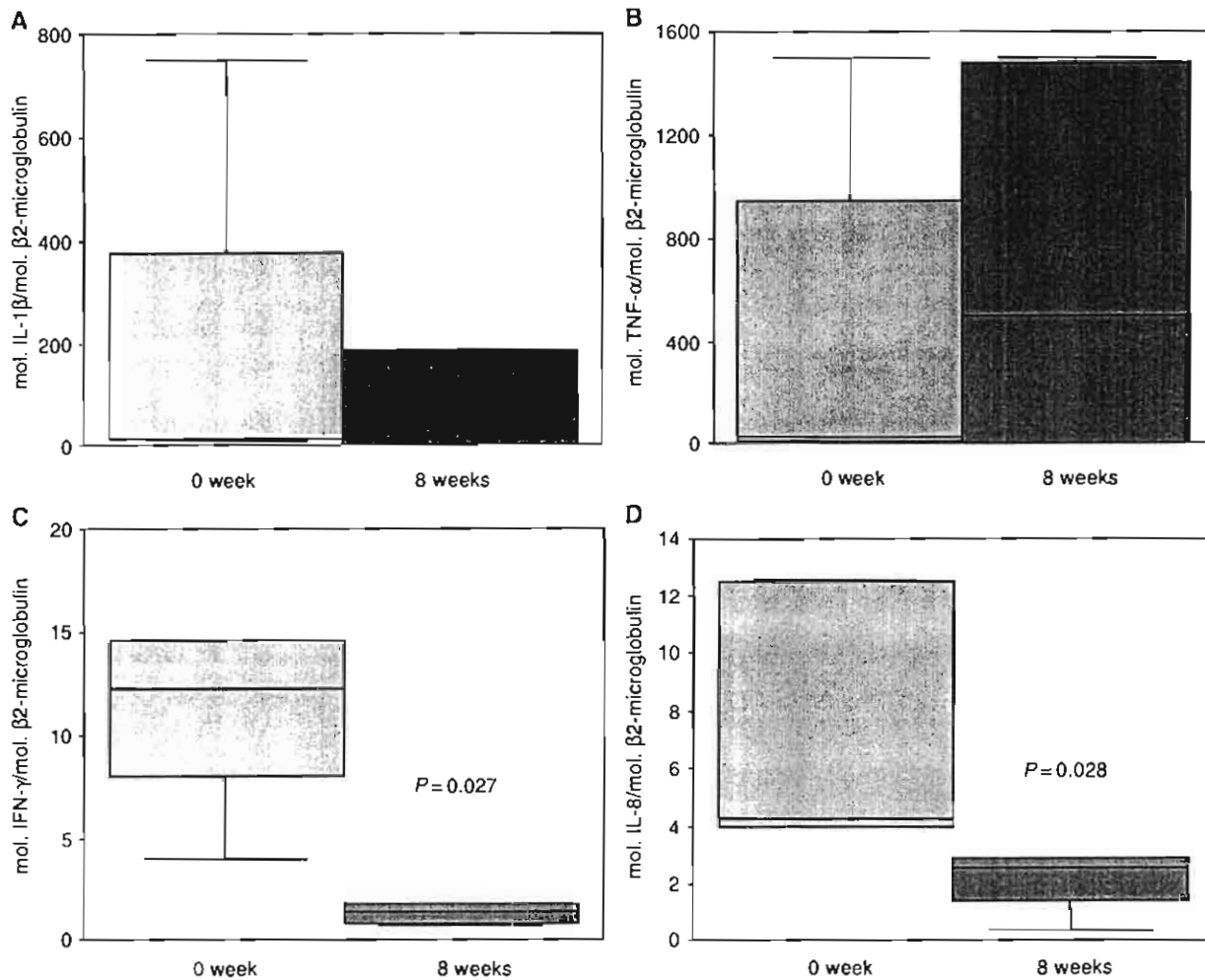


Figure 3 Cytokine mRNA expression in PBMC from six hepatitis C patients, at during the course of PTX administration: (A) IL-1 β ; (B) TNF- α ; (C) IFN- γ and (D) CXCL8 (IL-8) at pretreatment (0 week) and at 8 weeks. The results are shown as molecules of cytokine/10⁵ molecules of β 2-microglobulin.

different observations about the predominant T-cell response. On the other hand, measurement of mRNA and protein levels may yield discordant results due to the fact that many HCV strains encode cytokine analogues, cytokine receptor genes or proteins which bind cytokines [54].

Previous studies have established that the effective control of HCV replication cannot occur without a concurrent multispecific CD4 response that enhances and maintains the cytotoxic activity in concert with Th1 cytokines that can have an antiviral effect at the site of infection within the liver. Interestingly, different studies have shown that in chronic hepatitis C, a proportion of patients show active CTL responses easily detectable in the peripheral blood despite their inability to control HCV infection, the significance of this observation is yet ambiguous. It has been demonstrated that HCV

replication can also occur in mononuclear cells and that these cells may serve to transport HCV to lymphoid tissues [55], to inhibit the immune response or alternatively to sequester virions from recognition [5]. It has been reported that HCV persist in PBMC of patients that have achieved a sustained viral response with interferon and ribavirin whose significance still remains to be established [26].

Cytokines produced both locally within the liver and systemically may play an important role as stimulators or inhibitors of the disease process depending on their concentration and the time over which the cytokines exert relevant biological effects [24, 56, 57]. PTX provokes a significant inhibition in their expression, mainly at the liver site. Our study results support the view that PXT may be beneficial in the inhibition of inflammation in patients with CHC.

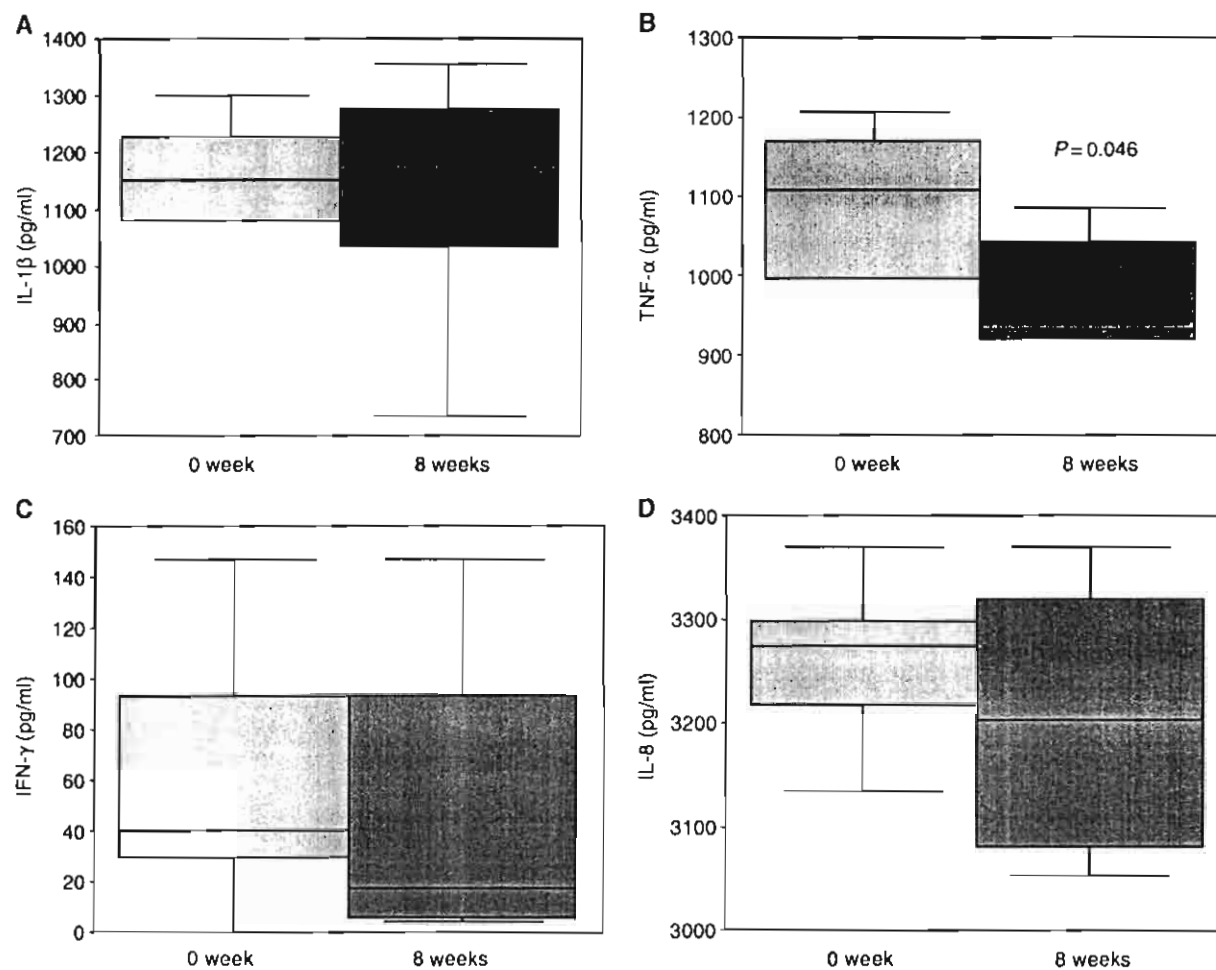


Figure 4 Cytokine levels secreted by PBMC from six hepatitis C patients during the course of PTX administration: (A) IL-1 β ; (B) TNF- α ; (C) IFN- γ and (D) CXCL8 (IL-8) at pretreatment (0 week) and at 8 weeks. The immunoassay results of protein quantification are shown in pg/ml.

Acknowledgments

This study has been supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT0810PM). The authors thank Dr David Shire of Sanofi Recherche, Centre de Labège for the gift of the plasmids for cytokine determined.

References

- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558–67.
- Poupon R. Hepatitis C: epidemiology, management and treatment. *Bull Acad Natl Med* 2005;189:375–84.
- St John TM, Sandt L. The hepatitis C crisis. *Ethn Dis* 2005;15:S52–S57.
- Bronowicki JP, Barraud H, Peyrin-Biroulet L. Epidemiology and natural history of hepatitis C. *Rev Prat* 2005;55:607–14.
- Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004;12:96–102.
- Racaneli V, Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003;24:456–64.
- Alter HJ, Seclrf LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000;20:17–35.
- Buti M, San Miguel R, Brosa M *et al.* Estimating the impact of hepatitis C virus therapy on future liver-related morbidity, mortality and costs related to chronic hepatitis. *J Hepatol* 2005;42: 639–45.
- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:215–29.
- Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999;30:595–01.
- Lechner F, Wong KH, Dunbar PR *et al.* Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499–512.
- Rosen HR. Hepatitis C pathogenesis: mechanisms of clearance and liver injury. *Liver Transpl* 2003;9:S35–S43.
- Gremion C, Cerny A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Rev Med Virol* 2005;15:235–68.
- Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41–52.
- Heo TH, Chang JH, Lee JW, Foung SK, Dubuisson J, Kang CY. Incomplete humoral immunity against hepatitis C virus is linked with distinct recognition of putative multiple receptors by E2 envelope glycoprotein. *J Immunol* 2004;173:446–55.

- 16 Rehmann B, Chang K, McHutchinson JG *et al.* Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 1996;70:7092–102.
- 17 Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;7:89–105.
- 18 Fan XG, Liu WE, Li CZ *et al.* Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. *Mediators Inflamm* 1998;7:295–7.
- 19 Koziel M. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1999;19:157–69.
- 20 Jacobson Brown PM, Neuman MG. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. *Clin Biochem* 2001;34:167–71.
- 21 Fukuda R, Ishimura N, Ishimura S *et al.* Intrahepatic expression of proinflammatory cytokine mRNA and interferon efficacy in chronic hepatitis C. *Liver* 1996;16:390–9.
- 22 Dumoulin FL, Leifeld L, Honecker U, Sauerbrunn T, Spengler U. Intrahepatic expression of interleukin-1b and tumor necrosis factor- α in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1999;180:1704–8.
- 23 Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W *et al.* Expression of cytokines (TNF- α , IL-1 α , and IL-2) in chronic hepatitis C: comparative hybridocytochemical and immunocytochemical study in children and adult patients. *J Histochem Cytochem* 2004;52:29–38.
- 24 Napoli J, Bishop GA, McCaughan GW. Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukins 2, 6, and 8 in human cirrhosis. *Gastroenterology* 1994;107:789–98.
- 25 Young KC, Chang TT, Liou TC, Wu HL. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. *J Med Virol* 1993;41:55–60.
- 26 Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J *et al.* Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:106–14.
- 27 Adams LA, Zein CO, Angulo P, Lindor KD. A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2365–8.
- 28 Koppa SW, Sahai A, Malladi P, Whittington PF, Green RM. Pentoxifylline attenuates steatohepatitis induced by the methionine choline deficient diet. *J Hepatol* 2004;41:592–8.
- 29 Satapathy SK, Garg S, Chauhan R *et al.* Beneficial effects of tumor necrosis factor- α inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1946–52.
- 30 Prandota J. Important role of proinflammatory cytokines/other endogenous substances in drug-induced hepatotoxicity: depression of drug metabolism during infections/inflammation states, and genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes/cytokines may markedly contribute to this pathology. *Am J Ther* 2005;12:254–61.
- 31 Coimbra R, Loomis W, Melbostad H, Tobar M, Porcides RD, Hoyt DB. LPS-Stimulated PMN activation and proinflammatory mediator synthesis is downregulated by phosphodiesterase inhibition: role of pentoxifylline. *J Trauma* 2004;57:1157–63.
- 32 Whitehouse MW. Anti-TNF- α therapy for chronic inflammation: reconsidering pentoxifylline as an alternative to therapeutic protein drugs. *Inflammopharmacology* 2004;12:223–7.
- 33 Lazarczyk M, Grzela T, Niderla J *et al.* Influence of pentoxifylline on perforin expression in human PBMC. *Int J Mol Med* 2004;14:725–8.
- 34 Austin AS, Mahida YR, Clarke D, Ryder SD, Freeman JG. A pilot study to investigate the use of oxpentifylline (pentoxifylline) and thalidomide in portal hypertension secondary to alcoholic cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:79–88.
- 35 Desmouliere A, Xu G, Costa AM, Yousef IM, Gabbiani G, Tuchweber B. Effect of pentoxifylline on early proliferation and phenotypic modulation of fibrogenic cells in two rat models of liver fibrosis and on cultured hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999;30:621–31.
- 36 Lee KS, Cottam HB, Houglum K, Wasson DB, Carson D, Chojkier M. Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitory activity. *Am J Physiol* 1997;27:G1094–G100.
- 37 Hernandez E, Correa A, Bucio L, Souza V, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC. Pentoxifylline diminished acetaldehyde-induced collagen production intrahepatic stellate cells by decreasing interleukin-6 expression. *Pharmacol Res* 2002;46:435–43.
- 38 Agarwal K, Kontorinis N, Dieterich DT. Alcoholic hepatitis. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2004;7:451–8.
- 39 Levitsky J, Mailliard ME. Diagnosis and therapy of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 2004;24:233–47.
- 40 Haber PS, Warner R, Seth D, Gorrell MD, McCaughan GW. Pathogenesis and management of alcoholic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1332–44.
- 41 Coimbra R, Porcides RD, Melbostad H *et al.* Nonspecific phosphodiesterase inhibition attenuates liver injury in acute endotoxemia. *Surg Infect (Larchmt)* 2005;6:73–85.
- 42 Raetsch C, Jia JD, Boigk G *et al.* Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002;50:241–7.
- 43 Windmeier C, Gressner AM. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. *Gen Pharmacol* 1997;29:181–96.
- 44 Myers RP, Ratzu V, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with historical features in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2419–25.
- 45 Legoux P, Minty C, Delpech B, Minty AJ, Shire D. Simultaneous quantitation of cytokine mRNAs in interleukin-1 beta stimulated U373 human astrocytoma cells by a polymerisation chain reaction method involving co-amplification with an internal multi-specific control. *Eur Cytokine Neww* 1992;3:552–63.
- 46 Chuang E, Del Vecchio A, Smolinski S, Song XY, Sarisky RT. Biomedicines to reduce inflammation but not viral load in chronic HCV – what's the sense? *Trends Biotechnol* 2004;22:517–23.
- 47 Zheng TS, Schlosser SF, Dao T *et al.* Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13618–23.
- 48 Kishihara Y, Hayashi J, Yoshimura E, Yamaji K, Nakashima K, Kashiwagi S. IL-1 beta and TNF- α produced by peripheral blood mononuclear cells before and during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1996;41:315–21.
- 49 Ramadori G, Armbrust T. Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:777–84.
- 50 Khabar KS, Al-Hai L, Al-Zoghaibi F *et al.* Expressed gene clusters associated with cellular sensitivity and resistance towards anti-viral and anti-proliferative actions of interferon. *J Mol Biol* 2004;342:833–46.
- 51 Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch D. Elevated levels of Interleukin-8 in serum are associated in Hepatitis C virus infection and resistance to Interferon therapy. *J Virol* 2001;75:6209–11.
- 52 Polyak SJ. Hepatitis C virus – cell interactions and their role in pathogenesis. *Clin Liver Dis* 2003;7:67–88.
- 53 Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:439–54.
- 54 Smith GL. Virus proteins that bind cytokines, chemokines or interferons. *Curr Opin Immunol* 1996;8:467–71.
- 55 Hahn YS. Subversion of immune response by hepatitis C virus: immunomodulatory strategies beyond evasion? *Curr Opin Immunol* 2003;15:443–9.
- 56 Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechanism of liver fibrogenesis: a homage to the role of activated fat storing cells. *Digestion* 1995;56:335–46.
- 57 Nelson DR. The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:931–53.

REVIEW ARTICLE

Liver Fibrosis and Chronic Viral Hepatitis

Gabriela Gutierrez-Reyes,^a Maria Concepcion Gutierrez-Ruiz,^b and David Kershenovich^a

^aDepartamento de Medicina Experimental, Hospital General de México, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

^bUniversidad Autónoma Metropolitana, México, D.F., México

Received for publication September 29, 2006; accepted October 2, 2006 (ARCMED-D-06-00425).

Liver fibrosis results from chronic damage to the liver in conjunction with the progressive accumulation of fibrillar extracellular matrix proteins. Fibrosis progression in patients with chronic viral hepatitis is a dynamic process where hepatic stellate cells, the most important contributor cell type, respond to a variety of host genetic factors and viral proteins. The abuse of alcohol, superimposed fatty liver disease, and age at the time of viral infection are some of the factors that accelerate liver fibrosis. Liver biopsy remains the gold standard to diagnose fibrosis and significant advances have been made to develop noninvasive markers for liver fibrosis. © 2007 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Hepatitis B, Hepatitis C, Liver fibrosis, Diagnosis.

Introduction

Hepatitis C and B convey a risk to develop chronic infection that can lead to liver fibrosis and eventually evolve to liver cirrhosis and primary liver cancer. Current understanding of hepatitis C and B viral infections has been advanced by the concept of liver fibrosis progression. Fibrosis was usually considered a progressive linear event; however, clinical evidence suggests that fibrosis progression does not always have a fixed speed or follow a linear pattern, but instead it can be accompanied by slower or rapid phases in their evolution (1). Either in chronic hepatitis C virus (HCV) or in hepatitis B virus (HBV) infection, antiviral therapy with viral clearance has been associated with a significant reduction of fibrosis (2–4). Evidence has been accumulating that even advanced fibrosis may be reversible (5–11). It may take years for significant regression to be achieved (12,13). Whether this beneficial effect on fibrosis results is an improvement in the long-term clinical outcome, including restoration of liver function and decreased portal hypertension, remains to be ascertained (14). To forecast which patient with chronic viral hepatitis will progress rapidly to fibrosis or cirrhosis is yet a thorny issue. Overall,

the time elapsed may vary between 10 and 50 years (15–16).

Fibrosis as a Dynamic Process

Liver fibrosis results from chronic damage to the liver in conjunction with the progressive accumulation of fibrillar extracellular matrix (ECM) proteins. The main causes of liver fibrosis include hepatitis C and B viral infections, alcohol abuse, and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Liver ECM is composed mainly by proteoglycans, glycosaminoglycans, and fibrous proteins (Table 1). It can be synthesized by hepatocytes, bile duct epithelial cells, and endothelial cells, but the largest contribution to ECM liver production is the fibroblastic cell population (17–19).

As the liver becomes fibrotic, the composition of the hepatic ECM changes. The total content of collagenous and non-collagenous components increases 3- to 5-fold, accompanied by a shift in the type of ECM in the subendothelial space from the normal low-density basement membrane-like matrix to an interstitial-type matrix containing fibril-forming collagens (20–23). Fibrosis develops with different spatial patterns corresponding with the diverse causes of parenchymal damage. As a consequence of viral infection, it is initially concentrated within and around the portal tract, giving place to portal-portal and portal-central septa.

Among the cell types potentially involved in the abnormal deposition of fibrillar ECM, the most studied

Address reprint requests to: Gabriela Gutierrez-Reyes, PhD, Academic, Universidad Nacional Autónoma de México, Department of Experimental Medicine, Dr. Batnis 148, Colonia Doctores, Cuauhtémoc, 06726 México, D.F., Mexico; E-mail: gabgurey@yahoo.com.mx

Table 1. Components of the extracellular matrix

ECM proteins (22,23)	Function (22,23)
Proteoglycans: aggrecan, betaglycan, decorin, perlecan, syndecan	Regulate the activities of secreted proteins Facilitate cell migration during tissue morphogenesis and repair Have a major role in chemical signaling between cells
Glycosaminoglycans: hyaluronan, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparan sulfate, keratan sulfate	Co-receptors that collaborate with conventional cell-surface receptor proteins, in both binding cells to the extracellular matrix and initiating the response of cells to some extracellular signal proteins Allows the rapid diffusion of nutrients, metabolites, and hormones between the blood and the tissue cells Forms hydrated gels and enables the matrix to withstand compressive forces
Fibrous proteins: collagens, elastin, fibronectin, laminin	Strengthen and help organize the matrix, and give it resilience Provide surfaces for cells to adhere to Influence survival, development, shape, polarity, and cell behavior to activate intracellular signaling pathways

contributors are the hepatic stellate cells (HSCs), which activate, following liver injury, into a myofibroblasts (MFs) phenotype and produce collagen between the liver (15,24). MFs are widely distributed cells with features of both fibroblasts and smooth muscle cells (25). They are important coordinating cells that have a significant influence on their environment by virtue of their receptors and the cell signals they produce. Their functions include roles in growth, differentiation, development, and healing during the inflammatory response (26,27). The existence of distinct ECM-producing cells, each with diverse localization and phenotype, has been identified in the liver (28). Furthermore MFs of bone marrow origin have been identified in fibrotic human and rat livers (29).

HSCs enclose the circumference of the fenestrated hepatic sinusoidal endothelia, which comprise the blood capillary floor in the liver. The change in sinusoidal fenestration by contraction and relaxation of HSCs is an important factor that participates directly in sinusoidal pressure. The pores of an endothelial cell decrease or disappear in the process of liver fibrosis progression. Thus, the increase of sinusoidal pressure expands the sinusoid and generates a mechanical stimulus to the HSCs that support the endothelial cells from Disse space (30). It has been reported that an active blood flow adjustment mechanism exists in the sinusoids, and that the contraction or relaxation of HSCs through vasoactive agents such as endothelin or nitric oxide participates directly in the sinusoidal pressure

(31,32). It has been suggested that the sinusoidal blood flow changes greatly as inflammation and fibrosis develop. As blood flow acts on a blood vessel and changes its function and structure, shear stress and stretch are the most important stress stimuli for a blood vessel and for cell-matrix interchange (33). Vascular smooth muscle cells carry out the production of the transforming growth factor (TGF- β) in a stretch stimulus and stimulate the production of collagen (34). The possibility of activation by the stretch stimulus through small GTP-binding proteins such as *ras*, the upper signaling molecule of MAP kinase, has been exposed (35).

Host Genetic Factors and Fibrosis

HSCs respond to the variety of factors present in the ECM, using diverse types of receptors. Integrins are crucially important because they are the main receptor proteins that cells use to both bind and respond to the ECM, as it has been largely demonstrated in HCV infection (36). Common characteristics of these receptors include that they are transmembrane proteins with an extracellular domain that interacts with the extracellular matrix components and an intracellular domain connecting to components of the cytoskeleton and members of different signal transduction cascades (37). All these interactions give place under different pathophysiological conditions to cellular phenotype and functional changes (38), which can result in distinct patterns of gene expression (Table 2).

There is increasing interest in the study of genetic markers that can reliably identify patients with chronic viral hepatitis developing progressive fibrosis. For that purpose, susceptibility or protective polymorphisms have been sought. An association study in patients with chronic hepatitis C (CHC) of 24,832 single nucleotide polymorphisms (SNPs), of which 1609 SNPs were significantly linked with advanced fibrosis and 100 were selected for validation in a replication cohort, evidenced that patients with CHC carrying a missense SNP in the DEAD box polypeptide 5 (DDX5) minor allele, or the haplotype composed of the DDX5-SNP and two neighboring POLG2-SNPs are at an increased risk of developing advanced fibrosis, whereas as those carrying a missense SNP in the carnitine palmitoyl-transferase 1A (CPT1A) minor allele are at a decreased risk (45,46).

Experimental data from animal models and clinical data from patients with HBV and HCV chronic infection suggest that inflammation associated cytokines including pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and TGF- β and anti-inflammatory cytokines such as interleukin 10 (IL-10) are involved in the development and progression of liver fibrosis. A possible linkage of IL-10 promoter haplotypes from SNP combinations (ATA, ACG, GCC) is associated with differential IL-10

Table 2. Host gene expression in chronic viral hepatitis C (fibrosis/cirrhosis)

Gene	Main source	Expression	Outcome	Reference
PDGF	HSCs	Upregulated	Activation of HSC in early injury	39
TGF- β 1	MFs	Upregulated	Inflammation, regeneration and fibrogenesis	22
Collagens COL1- A1	MFs	Upregulated	Liver fibrosis progression	36
TNF α , Interleukin 1,2,6,8,	Inflammatory cells	Upregulated	Inflammation and fibrogenesis	40,41
ADAMTS 1,8,13	HSCs	Upregulated	Facilitates secretion of matrix proteins. Fibrosis progression	36,42
MMPs: 1–3, 8,9,12–14	MFs	Upregulated	Progression of fibrosis	36,43
TIMPs: 2,3	MFs	Downregulated	Progression of fibrosis	36
LAMB1	MFs	Upregulated	Altered microvascular pressure between Disse sinus and hepatic sinusoids	36
LAMC1				
Cadherin	Liver cells	Downregulated	Activation and homing of T, B cells; infiltration of leukocytes and deposition of collagen	36
CD44	Liver cells	Upregulated		
ICAM 1	Liver cells	Upregulated		
Integrins (ITGA)	Liver cells	Upregulated	ECM remodeling; disease progression	36
Albumin, APO A 2, APO C3	Hepatocytes	Downregulated in F3-F4	Progression of liver fibrosis	44
Aldo-ketoreductase CYP2C8				

A disintegrin and metalloproteinase with Thrombospondin motifs (ADAMTS), Laminin beta 1 (LAMB1), Laminin gamma 1 (LAMC1).

expression. IL-10 promoter allelic frequencies of T and A at positions –819 and –592 as well as the frequencies of ATA haplotypes at positions –1082/–819/–592 are significantly higher in asymptomatic carriers relevant to a genetically low capacity of IL-10 production than in patients with progressive chronic liver disease who carry the GCC haplotype identified as a high IL-10 producer phenotype (47,48).

Considerable attention is focused on the polymorphisms in the gene encoding TGF- β , a multifunctional cytokine involved in wound healing and differentiation. TGF- β 1 polymorphisms are associated with fibrosis progression in Caucasian patients with CHC. TGF- α 1 allelic variations with the presence of prolines either in codon 25 or 10 are linked to the development of more severe fibrosis (49). A statistically significant relation has been found between a platelet-derived growth factor beta (PDGF- β) gene polymorphism at position +1135 and severity of fibrosis progression in patients with severe recurrent HCV infection after liver transplantation (50).

An individual association between polymorphisms of apolipoprotein E (APOE), the cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4), the hemochromatosis gene (HFE), the low-density lipoprotein receptor (LDRL), myeloperoxidase (MPO), microsomal triglyceride transfer protein (MTP), manganese superoxide dismutase (SOD2) and chemokine receptor 56 (CCR56), and liver fibrosis progression have been employed in combination to elaborate a specific profile as a possible predictive indicator of rapid liver fibrosis progression (38,51,52). The chemokine receptors CCR5, CCR2, and CCR3, and their ligands; Regulated on Activation, Normal T Expressed, and Secreted (RANTES), monocyte chemotactic protein-1 (MCP)-1, MCP-2, and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 α) in-

involved in the immune response and the selective recruitment of lymphocytes to the liver in HCV infection were also investigated. An amino acid change in MCP-2, Q46K, has been identified to correlate with the severity of liver fibrosis (53).

In patients with chronic hepatitis B, severity of fibrosis has been associated with different polymorphisms such as the polymorphisms in the core promoter region of the angiotensin gene (AGT 20 and AGT 6). A polymorphism in the estrogen receptor (ER) gene in which the Pp genotype and the P allele might be the susceptibility gene for HBV-induced cirrhosis while the pp genotype and the p allele might be the protective gene, and a polymorphism of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 are relevant to disease progression (52,54,55). As the interest in the field of fibrosis in chronic viral hepatitis expands, we can foresee the identification of new polymorphisms in the future.

The process of fibrosis also includes a regression phase, resulting in matrix degradation mediated by the action of a family of zinc-dependent enzymes known as matrix metalloproteinases (MMPs), which can destroy normal or abnormal ECM. Activated HSCs produce MMPs that are capable of cleaving native collagen through the helical portion of the molecule (56–58). At least 28 MMPs have been described, which fall into five categories based on substrate specificity: interstitial collagenases, gelatinases, stromelysins, membrane type, metalloelastase (59,60). Decreased activity of MMPs is mainly due to an overexpression of their specific inhibitors (TIMPs), which are a family of endogenous proteins that strictly regulate the activity of MMPs. There are four TIMPs differentially expressed by cells, TIMP-1, -2 and -4 are secreted, TIMP-3 is bound to extracellular matrix and TIMP-4 is mainly found in

vascular tissue (61). In chronic viral liver disease, significant increases in TIMP-1 and TIMP-2 have been documented (62–65). In addition to regulating degradation of ECM, newly described functions for MMPs and TIMPs such as involvement in activation of latent growth factors, inhibition of apoptosis and effects on cell proliferation may all contribute to progression of liver fibrosis (66).

Together these observations support the concept that fibrosis progression in patients with chronic viral hepatitis is indeed a dynamic process, occurring throughout a period of one or more decades, subject to changes emerging from the interplay of cell matrix interface, which in essence results in the deposition of fibrotic tissue. As molecular studies develop, we can expect the list of genes to enlarge, the task remaining to define their functional importance.

Viral Proteins and Fibrosis

As the molecular structures of hepatitis C and B viruses have been characterized, it has become evident that different regions of these viruses may indeed play a significant role in fibrosis development and progression. Different regions of the virus genome have been associated with fibrosis, apoptosis and other pathways leading to chronic liver damage.

In chronic HCV infection, the HCV core, and NS5 and NS3 regions have been demonstrated to interact with different host proteins resulting in a series of events that eventually lead to fibrosis progression (Table 3). These studies have been carried out mainly in experimental conditions using *in vitro* co-culture systems with HSC and HepG2 cell line transfected with the different viral proteins (71) and in liver biopsies of chronic hepatitis C patients in non-transplanted and transplanted patients (72).

Release factors that differentially modulate HSC expression of key genes involved in liver fibrosis in a clearly profibrogenic way, upregulating procollagen $\alpha 1$ (COL I), and procollagen $\alpha 3$ (COL III), TGF- $\alpha 1$ and downregulating fibrolytic metalloproteinases in hepatocytes have been characterized in a replicon Huh-7 model exploring the HCV from the NS3 through NS5B regions (73). Core and NS5A can enhance intracellular lipid accumulation via interactions with apolipoprotein A1 (APOA1) or A2 (APOA2), which cause inhibition of lipid transfer protein or defective synthesis and transport of very-low-density lipoprotein (VLDL). Taken together, the HCV proteins appear to induce both lipid accumulation and degradation, with consequent disarrangement of lipid compartmentalization and metabolism favoring ROS production (72).

The HBV virus is prone to mutations due to its asymmetric replication via reverse transcription of an RNA intermediate (74), the pre-S HBV deletion, the precore (PC) and the basal core-promoter (BCP) mutations occur in various stages of the chronic hepatitis B infection and have been demon-

Table 3. Viral proteins and its interactions with host proteins involved in fibrosis progression of patients with chronic hepatitis C

	Interacts with	Modulation	Reference
CORE	TNF- α lymphotoxin β receptors	Enhances the pro-apoptotic signal transduction and activates p53	66
	p38	Inhibit this mitogen activated kinase pathway promote Fas	66
	p21	Repress this cell cycle regulator and induce Fas	66,67
	APOA1 and APOA2	Inhibit assembly and secretion of regular VLDL: favoring ROS production	66
	Mitochondria	Induce ROS intermediates and thus oxidative stress: stimulate intracellular signaling pathways	66,68
NS5A	PKR	Control of cellular growth	66,69,70
	NF- κ B and STAT-3	Induction of oxidative stress and inflammation	66,68
	NF- κ B and c-Jun	Increases chemokine secretion and expression of ICAM-1	68
	Cdk1-cdk2 complex, APOA1 and APOA2	Favors cell cycle progression to G2-M. Inhibit lipid transfer protein or defective synthesis and transport of VLDL: favors ROS production	66
NS3	NF- κ B and c-Jun	Increase chemokine secretion and expression of ICAM-1	68

Apolipoprotein A1 and A2 (APOA1 and APOA2), protein kinase R (PKR), nuclear factor kappa B (NF κ B), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3), intercellular cell adhesion molecule type 1 (ICAM-1), reactive oxygen species (ROS), cyclin-dependent kinase 1 and 2 (cdk1 and cdk2).

strated to be associated with progression of the disease leading to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (75,76). Combination of mutations rather than a single mutation have been associated with the development of liver disease.

Further mapping of the pre-S deletion sequences found that all the deletion regions encompassed T- and B-cell epitopes (75).

The risk factors for HBV mutations are multiple. Taiwanese patients with genotype C, T1762 and A1764 mutations and an age \geq have more liver cirrhosis. In Caucasian patients, HBV/A/C and /D seem to be associated with more severe hepatic disease (77). HBV_e antigen-negative patients (HBeAg⁻) that have a higher frequency of mutations at core promoter nucleotides 1753 and 1773 and precore nucleotides 1846, 1896, and 1899 than HBeAg⁺ Taiwanese patients also show a more rapid progression of the disease (78).

Inflammation and Fibrosis

Chronic viral hepatitis is often silent and a significant number of persistently infected individuals remain unaware of infection even for decades. The cellular and humoral natural immune responses are unable to eradicate infection, yet are sufficient to sustain a low-grade liver inflammation. The liver is a source of many cytokines that may influence liver function. Among the cytokines, increased intrahepatic expression of TNF- α , IL-1 α and β , IL-2, IL-6, and IL-8 have been observed in chronic viral hepatitis. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) also produce different cytokines that are potentially involved in viral-induced liver damage. PBMCs are thought to have a role in viral persistence and clinical outcome, as these infected cells can serve as a viral reservoir and may become an extrahepatic peripheral viral replication source. Infected PBMCs may be involved in the selection and persistence of HCV genomic variants (79). Inflammatory cells, either lymphocytes or polymorphonuclear cells, activate HSCs to secrete ECM proteins. Activated HSCs secrete inflammatory chemokines, express cell adhesion molecules, and modulate the activation of lymphocytes. Therefore, a vicious circle in which inflammatory and fibrogenic cells stimulate each other is likely to occur. Apoptosis of damaged hepatocytes stimulates the fibrogenic actions of liver myofibroblasts (80).

Clinical Factors and Fibrosis Progression

Various factors have been identified to have a major impact on the natural history of chronic viral hepatitis and described to possibly accelerate fibrosis, although the underlying mechanisms are still under debate. These factors include abuse of alcohol, which has been demonstrated to modulate immunity, decrease hepatic natural killer (NK) activity and have an effect on the expression of LDLR and CD86, an effect indirectly mediated by TNF α and IL-1 β (81–83). Superimposed non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) may affect chronic viral-related fibrosis. Markers of obesity, body mass index (BMI), and HCV genotype 3 are associated with the extent of steatosis and type of fatty liver. Higher grade of steatosis and the presence of NASH are

both associated with advanced hepatic fibrosis (84). Mediators of the metabolic syndrome with insulin resistance such as adipokines, inflammatory cytokines, factors associated with oxidative stress, lipid peroxidation products, have been related to HSC activation and deposit of ECM (85). Associated immunosuppression, coinfection with HIV or hepatitis D virus, male gender, duration of infection, age (patients >40 years by the time of infection), presence of fibrosis on the index biopsy, schistosomal infection, iron overload, are other risk factors (86,87). The role of various genotypes and load are still controversial; however, progression to cirrhosis in hepatitis B correlates strongly with the level of circulating virus (46,88).

Estimating Liver Fibrosis

Liver Biopsy

Liver biopsy remains the gold standard to diagnose the presence of fibrosis or cirrhosis and stage the disease. It can provide additional information, allowing the identification of comorbidities. However, it is an invasive procedure with a morbidity rate of 0.3–0.6% and mortality rate up to 0.05%. Sampling error especially between stage 3 (extensive fibrosis) and stage 4 (cirrhosis), particularly with biopsies of small size, the use of semiquantitative scoring systems, inadequate interchange between the terms “fibrosis” and “cirrhosis”, and poor intra- and interobserver concordance are some of its limitations. In clinical practice, patients with chronic liver disease may be reluctant to undergo repeated liver biopsies. Its use to estimate the long-term dynamic process of liver fibrosis is troublesome; even if a second liver biopsy is obtained there is always the possibility during the comparison of confusing a rapidly progressive fibrosis, with an initial biopsy that underestimated the degree of fibrosis (89–92).

Serum Markers

A variety of noninvasive serological markers are now available for the clinician with the purpose of evaluating fibrosis in patients with chronic viral hepatitis. Although these tests can be used to stage the disease, their main usefulness lies in assessing fibrosis progression, based on the fact that they can be performed repetitively over the long-term course of the disease. The most frequently used marker in the clinical setting to follow a patient with hepatitis C, the measurement of aminotransferases (ALT and AST) does not predict fibrosis progression, and neither does the AST-ALT ratio. Several combinations of indirect or direct markers of fibrogenesis have been tested in cross-sectional studies and compared with liver biopsies with the main purpose to try to explore their value as predictors of fibrosis progression, such as the AST to platelet ratio (APRI) (93), the Fom's index based on a combination of age, platelet, γ GT, and

cholesterol determinations (94), the fibrosis probability index (FPI), which is calculated on a combination of HOMA-IR, age, cholesterol, AST, and alcohol intake (95), the GUCI score calculated by the combination of AST, INR and platelets (96), the Fibrotest, which includes a combination of alpha 2 macroglobulin (α 2M), ApoA1, bilirubin, γ GT, haptoglobin (97), among others. Several combinations of the different biomarkers are being tested at present. As more information becomes available in the near future the role of these tests in the clinical evaluation of patients with chronic viral hepatitis will be established.

Imaging

Utilization of imaging studies for evaluating fibrosis consider the use of the Duplex-Doppler ultrasound (US) as a noninvasive method for the assessment of hepatic hemodynamics beyond conventional gray-scale imaging US scoring system using both the low frequency and high frequency probes by evaluating the edge, surface and parenchymal texture of the liver have been employed to evaluate three different parameters: the bluntness of the liver edge, the irregularity of the surface and the coarseness of the parenchymal texture (98). US identification of liver fibrosis in chronic viral liver disease is possible with 25% sensitivity, 100% specificity, 100% positive predictive value and 79% negative predictive value, with an 80% diagnostic accuracy (99). Other US criteria selected as valuable predictors of fibrosis stage include the liver surface, the hepatic parenchymal echo pattern, and the wall thickness of gallbladder (100). A method for measuring liver stiffness using transient elastography (FibroScan; Echosens, Paris, France) shows promise as a quantitative method for noninvasive assessment of liver fibrosis (101,102).

In conclusion, liver fibrosis is a dynamic process recognized to play an important role in the pathophysiology of chronic viral hepatitis. Knowledge of the factors that determine fibrosis progression anticipate the development of new therapeutic opportunities.

References

1. Pinzani M. Non-invasive evaluation of hepatic fibrosis: don't count your chickens before they're hatched. *Gut* 2006;55:310-312.
2. Hache C, Villeneuve JP. Lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B and cirrhosis. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7: 1835-184.
3. Arima M, Terao H, Kashima K, Arita T, Nasu M, Nishizono A. Regression of liver fibrosis in cases of chronic liver disease type C: quantitative evaluation by using computed image analysis. *Intern Med* 2004;43:902-910.
4. Teoh NC, Farrell GC. Management of chronic hepatitis C virus infection: a new era of disease control. *Intern Med J* 2004;34:324-337.
5. Perez-Tamayo R. Cirrhosis of the liver: a reversible disease? *Pathol Annu* 1979;14:183-213.

6. Rojkind M, Dunn MA. Hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 1979;76: 849-863.
7. Kershenobich D, Vargas F, Garcia-Tsao G, Perez Tamayo R, Gent M, Rojkind M. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N Engl J Med* 1988;318:1709-1713.
8. Kershenobich D. Liver fibrosis and cirrhosis: are they reversible? *Rev Gastroenterol Mex* 2004;69:149-151.
9. Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, et al. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001;344:418-423.
10. Muretto P, Angelucci E, Lucarelli G. Reversibility of cirrhosis in patients cured of thalassemia by bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 2002;136:667-672.
11. Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003;327:143-147.
12. Ryder SD, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut* 2004;53:451-455.
13. Massard J, Ratziu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y, et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:S19-S24.
14. Fowell AJ, Iredale JP. Emerging therapies for liver fibrosis. *Dig Dis* 2006;24:174-183.
15. Friedman SL. Evaluation of fibrosis and hepatitis C. *Am J Med* 1999; 107:S27-S30.
16. Poynard T, Munteanu M, Ngo Y, Torres M, Benhamou Y, Thabut D, Ratziu V. Diagnostic value of FibroTest with normal serum aminotransferases. *Hepatology* 2006;43:374-376.
17. Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital. Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835.
18. Abdel-Aziz G, Rescan PY, Clement B, Lebeau G, Rissel M, Grimaud JA, et al. Cellular sources of matrix proteins in experimentally induced cholestatic rat liver. *J Pathol* 1991;164:167-174.
19. Bhunchet E, Wake K. Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. *Hepatology* 1992;16: 1452-1473.
20. Rojkind M, Greenwel P. The liver as a bio-ecological system. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, et al., eds. *The Liver. Biology and Pathobiology*. 2nd ed. New York: Raven Press;1988. pp. 1269-1285.
21. Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 1999;21: 475-490.
22. Friedman SL, Maher JJ, Bissell DM. Mechanisms and therapy of hepatic fibrosis: report of the AASLD Single Topic Basic Research Conference. *Hepatology* 2000;32:1403-1408.
23. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115: 209-218.
24. Geerts A. History and heterogeneity of stellate cells, and its role in normal liver function. *Semin Liver Dis* 2001;21:311-336.
25. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JJ, West AB. Myofibroblasts. I. Paraerine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999;277:C1-C9.
26. Friedman SL. Closing in on the signals of hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 1997;112:1406-1409.
27. Sappino AP, Shureh W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990;63:144-161.
28. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002;36:200-209.
29. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, et al. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004;126:955-963.

30. Reinhart-King CA, Dembo M, Hammer DA. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophys J* 2005;89:676–689.
31. Yee HF Jr. Rho directs activation-associated changes in rat hepatic stellate cell morphology via regulation of the actin cytoskeleton. *Hepatology* 1998;28:843–850.
32. Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997;25:2–5.
33. Lemmon CA, Sniadecki NJ, Ruiz SA, Tan JL, Romer IH, Chen CS. Shear force at the cell-matrix interface: enhanced analysis for microfabricated post array detectors. *Mech Chem Biosyst* 2005;2:1–16.
34. Li Q, Muragaki Y, Hatamura I, Ueno H, Ooshima A. Stretch-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rabbit aortic media and a possible involvement of angiotensin II and transforming growth factor-beta. *J Vasc Res* 1998;35:93–103.
35. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:8–14.
36. Xu X, Li YM, Ji H, Hou CZ, Cheng YB, Ma FP. Changes of ECM and CAM gene expression profile in the cirrhotic liver after HCV infection: analysis by cDNA expression array. *World J Gastroenterol* 2005;11:2184–2187.
37. Assoian RK. Anchorage-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol* 1997;136:1–4.
38. Bièche I, Asselah T, Laurendeau I, Vidaud D, Degot C, Paradis V, et al. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology* 2005;332:130–144.
39. Lau DT, Luxon BA, Xiao SY, Beard MR, Lemon SM. Intrahepatic gene expression profiles and alpha-smooth muscle actin patterns in hepatitis C virus induced fibrosis. *Hepatology* 2005;42:273–281.
40. Fukuda R, Ishimura N, Ishihara S, Chowdhury A, Moriyama N, Nogami C, et al. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNAs and interferon efficacy in chronic hepatitis C. *Liver* 1996;16:390–399.
41. Napoli J, Bishop GA, McCaughan GW. Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukins 2, 6, and 8 in human cirrhosis. *Gastroenterology* 1994;107:789–798.
42. Uenura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 2005;106:922–924.
43. Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004;99:271–279.
44. Shao RX, Hoshida Y, Otsuka M, Kato N, Tateishi R, Teratani T, et al. Hepatic gene expression profiles associated with fibrosis progression and hepatocarcinogenesis in hepatitis C patients. *World J Gastroenterol* 2005;11:1995–1999.
45. Huang H, Shiffman ML, Chung RC, Layden TJ, Friedman S, Abar OT, et al. Identification of two gene variants associated with risk of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2006;130:1679–1687.
46. Lacombe K, Massari V, Girard PM, Serfaty L, Gozlan J, Pialoux G, et al. Major role of hepatitis B genotypes in liver fibrosis during coinfection with HIV. *AIDS* 2006;20:419–427.
47. Zhang LJ, Wang XZ. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:1681–1685.
48. Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1163–1169.
49. Wang H, Mengsteab S, Tag CG, Gao CF, Hellerbrand C, Lammert F, et al. Transforming growth factor-beta 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2005;11:1929–1936.
50. Ben-Ari Z, Tambur AR, Pappo O, Sulkes J, Pravica V, Hutchinson I, et al. Platelet-derived growth factor gene polymorphism in recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Transplantation* 2006;81:392–397.
51. Hennig BJ, Hellier S, Frodsham AJ, Zhang L, Klenerman P, Knapp S, et al. Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. *Genes Immun* 2002;3:359–367.
52. Mohammadzadeh Ghobadloo S, Yaghmaci B, Allamch A, Hassani P, Noorinayer B, Zali MR. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1 in patients with HBV-related liver cirrhosis, chronic hepatitis, and normal carriers. *Clin Biochem* 2006;39:46–49.
53. Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, et al. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1468–1476.
54. Xiao F, Wei H, Song S, Li G, Song C. Polymorphisms in the promoter region of the angiotensinogen gene are associated with liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1488–1491.
55. Xie JP, Gong XQ, Tan DM, Liu F, Zhou JL. Estrogen receptor gene polymorphisms and HBV-induced liver cirrhosis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006;31:379–382.
56. Montfort I, Perez-Tamayo R. Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. *Am J Pathol* 1978;92:411–420.
57. Schaefer B, Rivas-Estilla AM, Meraz-Cruz N, Reyes-Romero MA, Hernandez-Nazara ZH, Dominguez-Rosaes JA, et al. Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2003;162:1771–1780.
58. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373–384.
59. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245–G249.
60. Hájová E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy* 2005;106:127–132.
61. Osman M, Tortorella M, Londei M, Quarantino S. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases define the migratory characteristics of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 2002;105:73–82.
62. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Oshita M, Katayama K, Kato M, et al. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J Hepatol* 1997;26:574–583.
63. Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002;316:71–81.
64. Koulentaki M, Valatas V, Xidakis K, Kouroumalis A, Petinaki E, Castanas E, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in acute viral hepatitis. *J Viral Hepat* 2002;9:189–193.
65. Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, Morel F, Zarski JP. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004;99:271–279.
66. Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:S88–S91.
67. Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003;10:S59–S67.

68. Marshall A, Rushbrook S, Davies SE, Morris LS, Scott IS, Vowler SL, et al. Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2005;128:33–42.
69. Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lcinasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004;126:529–540.
70. Franco S, Gimenez-Barcons M, Puig-Basagoiti F, Forcic I, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, et al. Characterization and evolution of NS5A quasispecies of hepatitis C virus genotype 1b in patients with different stages of liver disease. *J Med Virol* 2003;71:195–204.
71. Shin JY, Hur W, Wang JS, Jang JW, Kim CW, Bae SH, et al. HCV core protein promotes liver fibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF-beta1. *Exp Mol Med* 2005;37:138–145.
72. Lopez-Labrador FX, Bracho MA, Berenguer M, Coscolla M, Rayon JM, Prieto M, et al. Genetic similarity of hepatitis C virus and fibrosis progression in chronic and recurrent infection after liver transplantation. *J Viral Hepat* 2006;13:104–115.
73. Schulze-Krebs A, Preimel D, Popov Y, Bartenschlager R, Lohmann V, Pinzani M, et al. Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2005;129:246–258.
74. Buti M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Esteban R. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *J Clin Virol* 2005;34:S79–S82.
75. Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 2006;130:1153–1168.
76. Lin CL, Liao LY, Wang CS, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, Kao JH. Basal core-promoter mutant of hepatitis B virus and progression of liver disease in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Liver Int* 2005;25:564–570.
77. Ganne-Carrie N, Williams V, Kaddouri H, Trinehet JC, Dziri-Mendi S, Alloui C, et al. Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *J Med Virol* 2006;78:335–340.
78. Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Eng HL, Huang CM, et al. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005;43:6000–6006.
79. Gutierrez-Reyes G, Lopez-Ortal P, Sixtos S, Cruz S, Ramirez-Iglesias MT, Gutierrez-Ruiz MC, et al. Effect of pentoxifylline on levels of pro-inflammatory cytokines during chronic hepatitis C. *Scand J Immunol* 2006;63:461–467.
80. Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E, Bronk SF, Gores GJ. The ease-pase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:1191–1196.
81. Pan HN, Sen R, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:1615–1623.
82. Carriere M, Rosenberg AR, Conti F, Chouzenoux S, Terris B, Sogni P, et al. Low density lipoprotein receptor transcripts correlates with liver hepatitis C virus RNA in patients with alcohol consumption. *J Viral Hepat* 2006;13:633–642.
83. Brown LA, Cook RT, Jerrells TR, Kolls JK, Nagy LE, Szabo G, et al. Acute and chronic alcohol abuse modulate immunity. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:1624–1631.
84. Younossi ZM, McCullough AJ, Ong JP, Barnes DS, Post A, Tavill A, et al. Obesity and non-alcoholic fatty liver disease in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:705–709.
85. Bondini S, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C infection. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2006;52:135–143.
86. Alberti A, Vario A, Ferrari A, Pistis R. Review article: chronic hepatitis C natural history and cofactors. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:S74–S78.
87. Farid A, Al-Sherbiny M, Osman A, Mohamed N, Saad A, Shata MT, et al. Schistosoma infection inhibits cellular immune responses to core HCV peptides. *Parasite Immunol* 2005;27:189–196.
88. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130:678–686.
89. Grant A, Neuberger J. Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice. *Gut* 1999;45: S1V1–S1V11.
90. Dienstag JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S152–S160.
91. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:1449–1457.
92. Rousslelet MC, Michalak S, Dupre F, Croue A, Bedossa P, Saint-Andre JP, et al. Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology* 2005;41:257–264.
93. Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518–526.
94. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986–992.
95. Sud A, Hui JM, Farrell GC, Bandara P, Kench JG, Fung C, et al. Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology* 2004;39:1239–1247.
96. Islam S, Antonsson L, Westin J, Lagging M. Cirrhosis in hepatitis C virus-infected patients can be excluded using an index of standard biochemical serum markers. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:867–872.
97. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069–1075.
98. Schneider AR, Teuber G, Kriener S, Caspary WF. Noninvasive assessment of liver steatosis, fibrosis and inflammation in chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2005;25:1150–1155.
99. D'Onofrio M, Martone E, Brunelli S, Faccioli N, Zamboni G, Zagni I, et al. Accuracy of ultrasound in the detection of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *Radiol Med (Torino)* 2005;110:341–348.
100. Zheng RQ, Wang QH, Lu MD, Xie SB, Ren J, Su ZZ, et al. Liver fibrosis in chronic viral hepatitis: an ultrasonographic study. *World J Gastroenterol* 2003;9:2484–2489.
101. Castera L, Vergniol J, Foueher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343–350.
102. Sebastiani G, Vario A, Ferrari A, Pistis R, Noventa F, Alberti A. Hepatic iron, liver steatosis and viral genotypes in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2006;13:199–205.