



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
METROPOLITANA



COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

CBS

227417

DETERMINACION DE CITOCINAS Y FACTORES  
DE CRECIMIENTO EN LINFOCITOS DE PACIENTES  
CON CIRROSIS HEPATICA Y HEPATITIS CRONICA  
TRATADOS CON DIFERENTES FARMACOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN BIOLOGIA

E X P E R I M E N T A L

P R E S E N T A

Q.F.B. MARIA PIEDAD LOPEZ ORTAL

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. FLORENCIA VARGAS VORACKOVA  
M. EN C. ESPERANZA GABRIELA GUTIERREZ REYES

MEXICO, D.F.

2001.

*NADA ES TAN FACIL COMO PARECE*

A mis padres  
por todo lo que me han enseñado

A mi hermana Lola  
por todo lo que hemos compartido

A mis tíos  
por su apoyo

**Al Dr. David Kershenobich  
por haberme permitido formar parte del Departamento de  
Gastroenterología**

**A la Dra. Florencia Vargas  
por dirigirme y orientarme en la realización de mi tesis**

**A la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez  
por apoyarme nuevamente en la realización de mi tesis**

**A Gaby  
por compartir sus conocimientos y experiencias conmigo, por  
haberme ayudado a superar todos los obstáculos que se me  
presentaron para extraer el RNA y por haber compartido todos  
mis éxitos**

**A mis compañeros de Laboratorio Soco, Tere, Sara, Alma,  
Rosi, Beto, Varenka, Alina y Bety  
por todos los convivios y buenos ratos que pasamos**

**A Juanita González y Juanita Guzmán  
por todo el material lavado y esterilizado, ya que sin él no  
hubiera sido posible realizar los experimentos**

**A Ricardo y Rosi  
por todos sus servicios prestados**

**A las secretarias del Departamento Vero, Elizabeth, Edvina, Rocío, Soco, Lulú Zamora por todas las atenciones prestadas y en especial a Lety y Lulú Morales por su donación altruista de sangre para que perfeccionara la técnica de extracción de RNA**

**A la Dra. Josefina Alberú, Jefa del Departamento de Transplantes, por haberme permitido trabajar en su laboratorio durante la remodelación del Laboratorio de Gastroenterología**

**A Claudia, Norma, Natalia y Mayra del Laboratorio de Transplantes, por haber compartido su laboratorio y experiencia conmigo y por todas las cápsulas culturales que compartimos**

**A Pablo Damián  
por haberme permitido analizar mis geles en su laboratorio**

**A mis maestros  
por haberme brindado sus conocimientos para forjarme como investigadora**

**A mis compañeros Lety, Paty, Laura, Lucía, Ascensión, Carmen, Xochitl, Victor, Luis y Eloy  
por todas las horas de estudio y diversión que compartimos**

**A Olga, Moraima, Nohemí, Fabiola, Alejandra y Esther  
por lo vivido, soñado y logrado, por que gracias a su apoyo  
desinteresado he logrado una meta más**

**A Mary y Frank  
por brindarme su gran amistad**

## LUGAR DE DESARROLLO

El presente trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Florencia Vargas Vorackova y de la M en C. Gabriela Gutiérrez Reyes y de la asesoría de la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz en el Laboratorio de Gastroenterología del Departamento de Gastroenterología en el Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, se encuentra dentro del padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por CONACyT con el número de registro: 124701

\*\*\*\*\*

1.- Introducción	
1.1.- Hepatitis por virus C	2
1.2.- Carga viral	3
1.3.- Fibrosis hepática	3
1.4.- Cirrosis hepática	4
1.5.- Transaminasas	4
1.6.- Citocinas y daño hepático	5
1.7.- Tratamiento utilizado	9
2.- Justificación	12
3.- Objetivos	13
4.- Material y Métodos	
4.1.- Muestra	14
4.2.- Metodología	15
4.3.- Cuantificación de la carga viral	15
4.4.- Obtención de linfocitos	16
4.5.- Determinación de citocinas	16
4.6.- Extracción de ARN	16
4.7.- Determinación de la expresión de las citocinas	17
4.8.- Determinación de la secreción de las citocinas	19
4.9.- Análisis estadístico	20
5.- Resultados	
5.1.- ALT y AST	22
5.2.- Carga viral	29
5.3.- Expresión y secreción de IL-1 $\beta$	33
5.4.- Expresión y secreción de TNF- $\alpha$	40
5.5.- Expresión y secreción de IL-8	45
5.6.- Expresión y secreción de IFN- $\gamma$	51
6.- Discusión	59
7.- Conclusión	68
8.- Bibliografía	69

## ABREVIATURAS

\*\*\*\*\*

ALT	Alanina Amino Transferasa
AST	Aspartato Amino Transferasa
ARN	Acido Ribonucléico
DEPC	Dietil Pirocarbonato
HB	Hepatitis B
HBcAb	Anticuerpo contra el Core de HB
HBcAg	Antígeno Core de HB
HbsAg	Antígeno de Superficie de HB
HSC	Células Estelares Hepáticas
IFN	Interferón
Kda	Kilodaltones
LPS	Lipopolisacárido
mg/dl	Miligramos/decilitros
mEq/ml	Miliequivalentes/mililitro
M.U.	Millones de Unidades
μl	Microlitros
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PFH	Pruebas de Función Hepática
PTX	Pentoxifilina
pg/ml	Picogramos/mililitro
U.I/l	Unidades Internacionales/litro
VHC	Virus de la Hepatitis C

\*\*\*\*\*

## 1. - INTRODUCCION

La cirrosis hepática es una enfermedad muy común en diversos países como resultado de un abuso en el consumo de alcohol o de una hepatitis crónica entre otras causas. En México ocupa el 4º lugar como causa de muerte entre los 25 y 64 años de edad.

La cirrosis resulta de una inhabilidad del hígado para restaurar la homeostasis que ha sido alterada por agentes biológicos ó químicos que provocan una lesión en este.

Entre las principales características de la cirrosis se encuentran el incremento en el almacenamiento de los componentes de la matriz extracelular, la transformación de las células estelares a miofibroblastos y una alteración de la arquitectura normal del hígado con formación de nódulos de regeneración.

La fibrogénesis es un proceso dinámico que resulta en la acumulación de proteínas extracelulares que conforman la cicatriz del hígado, constituida a su vez de colágena fundamentalmente de tipo I y III, proteoglicanos, fibronectina y ácido hialurónico. El hígado cirrótico llega a contener aproximadamente 6 veces más colágena y proteoglicanos que el hígado normal.

La respuesta del hígado al daño por alcohol y/o virus se establece a través de una serie de eventos fisiológicos y bioquímicos tales como la síntesis de factores de crecimiento y citocinas, diseñados para restablecer la integridad anatómica y funcional.

Los tratamientos que se han utilizado hasta la actualidad se han enfocado principalmente al manejo de las complicaciones, tales como la ascitis o los sangrados, sin embargo, hasta la fecha esto no ha tenido impacto sobre la prevalencia de la enfermedad y las terapias se aplican en forma tardía, una vez que el daño tisular ya es irreversible.

Estudios recientes sobre la fisiopatología de la enfermedad han permitido el desarrollo de medidas preventivas más adecuadas consistentes en la eliminación del agente causal, tales como la vacunación contra el virus de hepatitis B, la determinación de agentes virales en productos sanguíneos y la suspensión de la ingesta de alcohol, así como el desarrollar intervenciones terapéuticas con el empleo de agentes antifibrogénicos y/o antiinflamatorios.

\*\*\*\*\*

## 1.1.- HEPATITIS POR VIRUS C

La hepatitis viral C es un problema de salud pública y la causa más común de enfermedad hepática en el mundo. Es una enfermedad a menudo asintomática, transmitida por la sangre, los productos sanguíneos y el trasplante de órganos, dando lugar a la hepatitis crónica que puede progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (Blum, HE. 1997) generalmente después de 10 años. Es responsable de la mayor parte de los casos de hepatitis post-transfusional. En México, su frecuencia es aproximadamente del 1.4% de la población general.

El virus de la hepatitis C (VHC) fue identificado en 1989 como el agente responsable en muchos de los casos de las infecciones de hepatitis no A - no B (Walker, MA. 1999). Una vez que el VHC llega al hígado a través de la vía sanguínea, su actividad infecciosa depende de su capacidad de adherirse a los hepatocitos, penetrar su membrana celular por medio de translocación y separarse de su capsida. Una vez que los viriones se han replicado pueden salir del hepatocito por lisis celular o por medio de la secreción sin que la célula sufra destrucción (Villalobos, JJ y col. 2000). Su replicación en los hepatocitos es usualmente acompañada por anomalías en las pruebas hepáticas, incluyendo la elevación de los niveles séricos de las transaminasas (Tassopoulos, N.C. 1993). Gracias a su notable mutabilidad, presenta una gran habilidad para eludir la acción del sistema inmune y mantener así la infección activa durante muchos años (Sanchez-Tapías, JM. 1997).

Los pacientes con una infección aguda desarrollan una infección crónica aproximadamente en un 80% (Muir, AJ. 2000), el 50% de estos casos evolucionan a hepatitis crónica activa, cirrosis o cáncer.

La infección crónica por VHC puede desarrollarse con o sin anomalías en ALT y con o sin inflamación (Alberti, A y col. 1999), también se ha visto que la infección por VHC no está relacionada con la edad, sexo, niveles de ALT, vía de infección o títulos séricos del virus (Chang, TT y col. 1996).

Actualmente, el tratamiento de la hepatitis C, está enfocado a detener su progresión.

\*\*\*\*\*

## 1.2.- CARGA VIRAL

Aunque el VHC es considerado esencialmente hepatotrópico, estudios recientes indican que también puede ser encontrado en lugares extrahepáticos (Qian, C y col 1992; Trimoulet, P y col. 2000), como células mononucleares de sangre periférica (PBMC), suero y plasma (Schmidt, W y col. 1998).

La detección del ARN del VHC en circulación puede proveer una evidencia directa de la viremia (Nakagawa, H y col. 1994), ya que altos niveles de ARN de este virus han sido encontrados en pacientes con una hepatitis crónica activa (Simmonds, P y col. 1990). La presencia del ARN de este virus en las células PBMC puede reflejar la fagocitosis del virus circulante, o bien, que el virus puede tener la capacidad de infectarlas y replicarse dentro de ellas y entonces pueden funcionar como reservorio (Trimoulet, P y col. 2000).

La detección de este virus en suero ó plasma, no solo ayuda al diagnóstico de la infección, sino también para monitorear la viremia durante el curso de la terapia (Nakagawa, H y col. 1994).

## 1.3.- FIBROSIS HEPATICA

La fibrosis es una respuesta reversible que ocurre en casi todos los pacientes con una lesión hepática crónica. Puede dar lugar a la cirrosis, un estado irreversible caracterizado por la formación de nódulos y la contracción del órgano (Friedman, SL. 1993).

La fibrosis hepática es caracterizada por el incremento de los componentes de la matriz extracelular, lo que constituye la cicatriz hepática. Esta cicatriz consiste en la formación de fibras de colágena principalmente de tipo I y III, así como proteoglicanos, fibronectina y ácido hialurónico. La fibrosis también puede impedir el intercambio de solutos entre el espacio sinusoidal y los hepatocitos. Debido a que la primera fase de la cascada fibrogénica es iniciada en el espacio de Disse, los esfuerzos para identificar las fuentes celulares de la matriz extracelular se han enfocado en las regiones celulares, teniendo así a las células del espacio endotelial, los hepatocitos y las células estelares.

Las células estelares en el hígado normal se distinguen por contener vitamina A pero ésta se pierde cuando las células estelares se transforman a

\*\*\*\*\*

miofibroblastos y comienzan a expresar ARNm que codifica para colágena y laminina. Las moléculas de la matriz que producen los miofibroblastos incluyen cinco tipos de colágena, heparan sulfato, dermatan, proteoglicanos, laminina, fibronectina celular, tenascina y decorina (Friedman, SL. 1993).

## 1.4.- CIRROSIS HEPÁTICA

La cirrosis hepática es una alteración difusa del hígado caracterizada por pérdida de la arquitectura como consecuencia de fibrosis y regeneración nodular. En un estado prolongado puede ocurrir una falla severa o un carcinoma hepatocelular (Matsuda, Y y col. 1997). Está caracterizada por una hiperacumulación de los componentes del tejido conectivo en el hígado (Matsuda, Y y col. 1997).

La aparición de la cirrosis hepática es generalmente insidiosa y asociada a síntomas no específicos como la fatiga, la anorexia, la pérdida de peso y las molestias abdominales, antes de que se presente el cuadro clásico de hipertensión portal (sangrado, várices, ascitis) o insuficiencia hepática.

Es importante enfatizar que hay 2 etapas diferentes de la cirrosis; una comprende al proceso activo, cuando las células inflamatorias se encuentran presentes en el sitio de la lesión y hay una producción activa de componentes de la matriz extracelular. La segunda comprende al estado terminal, en el cual, el tejido fibroso es acelular y existen pocas células inflamatorias en la matriz extracelular (Greenwel, P y col. 1994).

## 1.5.- TRANSAMINASAS

Cuando las células se lesionan en forma aguda, los mecanismos intracelulares reguladores se alteran, permitiendo la salida de cantidades importantes de transaminasas cuya identificación permite establecer el diagnóstico con gran exactitud. En la hepatitis viral se han llegado a encontrar cifras superiores a 10,000 U.I/l. Al interpretar las transaminasas es muy importante tomar en cuenta el lapso transcurrido entre el principio de la enfermedad hepática y el momento del análisis, ya que en la etapa inicial de la lesión hepatocelular aguda las transaminasas se elevan bruscamente para declinar después de algunos días en correlación al grado y tratamiento de la

\*\*\*\*\*

lesión (Villalobos, JJ. 1988). Habitualmente se acepta que las cifras mayores de 500 U.I/l son útiles para el diagnóstico de hepatitis.

Hay reportes que indican que AST es un mejor marcador del daño en el hígado que ALT (Assy, N y col. 2000). Algunos pacientes pueden presentar un daño hepático y tener valores normales de estas transaminasas.

## 1.6.- CITOCINAS Y DAÑO HEPATICO

Independientemente del factor causante del daño, el hígado desarrolla una respuesta uniforme al daño crónico. La necrosis hepatocelular es seguida de fibrosis y cirrosis. Aunque el mecanismo fibrogénico no es totalmente conocido, existen evidencias de que diversas citocinas son capaces de actuar en las distintas células hepáticas induciendo modificaciones intracelulares que culminan con el depósito de colágena y el desarrollo de la cirrosis.

Las citocinas son polipéptidos de peso molecular bajo (Bienvenu, JAD y col. 1998), aproximadamente 80 Kda (Andus, T y col. 1991), sintetizadas y liberadas por numerosas células como los monocitos, los macrófagos, los linfocitos, los hepatocitos, las células endoteliales, las células de músculo liso, las células estelares y las células de Kupffer (Andus, T y col. 1991). Integran una gran red de mediadores moleculares que constituyen un sistema de comunicación coordinado entre las células y los tejidos (Andus, T y col. 1991). Se encargan fundamentalmente de restablecer o mantener la homeostasis fisiológica. Tienen diversas actividades biológicas que a menudo se sobreponen y que se cree influyen de manera importante en los procesos de daño y regeneración hepática (Missale, G y col. 1995).

Por sus características efectoras, las citocinas se han agrupado en aquellas que poseen propiedades inflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) ó el Factor de Crecimiento Transformante (TGF- $\beta$ ); quimiotácticas como la interleucina-8 (IL-8); antiinflamatorias como interleucina-10 (IL-10); de fase aguda como interleucina-6 (IL-6) (Llorente, L y col. 1996).

De acuerdo a un modelo de hepatitis inducido, se tiene que, una lesión en los hepatocitos libera factores que atraen a las células de Kupffer y a fagocitos mononucleares reclutados de la sangre y médula ósea. Una vez localizados en el hígado, los macrófagos se activan por factores derivados de los hepatocitos o directamente por agentes fibrogénicos (exceso de vitamina A) y liberan citocinas como IL-1, la cual induce la proliferación y activación de las células endoteliales (Hassan, G y col. 1997).

\*\*\*\*\*

### *Interleucina-1 $\beta$*

La interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) es producida por monocitos/macrófagos, células T, células B, asesinas naturales (NK), neutrófilos, células de músculo liso, fibroblastos y astrocitos (Vilcek, J y col. 1994). Tiene una gran participación en los procesos inflamatorios (Dinarelo, CA. 1994) y se conoce su propiedad moduladora sobre la liberación de otras citocinas ( Andus, T y col. 1991) como la IL-6 y la IL-8; induce el incremento de la expresión de la IL-2 en las células T (Vilcek, J y col. 1994); es capaz de inducir síntesis de radicales libres de oxígeno a nivel de los granulocitos, así como su degranulación. Es posible que en pacientes con cirrosis hepática, la sobreestimación de células mononucleares en respuesta a productos resultantes del daño tisular, complejos inmunes circulantes y a la exposición repetida a lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, predisponga al desarrollo de la inflamación y el daño crónico mediado por las citocinas. Existen evidencias de su actividad proliferativa sobre las células estelares con el consiguiente aumento de la cantidad total de colágena (Andus, T y col. 1991).

Se observa que hay un incremento en la producción de IL-1 por las PBMC, confirmando que está elevada la concentración en el suero de los pacientes con VHC y que los niveles de citocinas no correlacionan con los niveles de ALT; esto sugiere que el incremento en la producción puede ser debido a la infección pero no a la inflamación (Kishihara, Y y col. 1996).

### *Interleucina-8*

La interleucina 8 (IL-8) es una citocina proinflamatoria conocida como quimiotáctica para los neutrófilos (Shimoda, K y col. 1998). Es producida por hepatocitos en respuesta al TNF (Hill, D y col. 1997) y monocitos. La identificación de esta citocina en las etapas finales de la enfermedad eleva la posibilidad de que puede estar activa en las primeras etapas del proceso de cirrosis (Napoli, J y col. 1994). Es producida en respuesta a un estímulo exógeno como virus, bacterias, LPS y endógeno como IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (Mahalingam, S y col. 1999). Estudios previos demuestran que la secreción de IL-8 o la expresión del gen en una enfermedad crónica hepática, como la cirrosis, se encuentra elevada en comparación con el control (Shimoda, K y col. 1998).

\*\*\*\*\*

*Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$* 

El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) es una citocina sintetizada principalmente por macrófagos/monocitos (Knittel, T y col. 1997), en respuesta a estímulos infecciosos, traumáticos, neoplásicos o enfermedades inflamatorias crónicas. Tiene propiedades antineoplásicas, antivirales e inmunomoduladoras (Kowdley, K. 1999). Puede inducir la liberación de citocinas IL-1, EGF, PDGF y TGF- $\beta$  (Thiele, DL y col. 1989). Se ha demostrado su participación en respuesta a estímulos químicos y bacterianos en el daño hepatocelular mediado por macrófagos en forma aguda (Nagakawa, J y col. 1990; Khoruts, A y col. 1991), confiriéndole capacidades citotóxicas, con la consiguiente producción de radicales libres de oxígeno (Ward, A y col. 1987; Lee, KS y col. 1997). Al igual que la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  posee la capacidad de regular la expresión de moléculas adherentes en las superficies de las membranas de células endoteliales y neutrófilos, favoreciendo además la síntesis de radicales libres y su degranulación (Colletti, LM y col. 1990; Ramadori, G y col. 1993). Estudios "in vivo" han demostrado un incremento significativo en los niveles séricos y número de receptores (R55 y R75) de TNF- $\alpha$  en pacientes con daño hepático agudo y crónico (Deviere, J y col. 1990; Armendariz-Borunda, J y col. 1991; Miller, LC y col. 1992). En la actualidad se estudian sus efectos sobre la síntesis y la degradación de la colágena y aunque existe aún controversia, parece importante su participación en el proceso de fibrogénesis (Weiner, FR y col. 1990; Andus, T y col. 1991).

Los valores serológicos del TNF- $\alpha$  se encuentran elevados en pacientes con hepatitis crónica y cirrosis por alcohol o virus (Knittel, T y col. 1997). Hay estudios que indican que el TNF- $\alpha$  juega un papel importante en la reparación del tejido hepático.

El efecto fisiológico del TNF- $\alpha$  depende de su sitio de producción, su concentración local y la presencia de otras citocinas (Knittel, T y col. 1997) ya que niveles pequeños de TNF- $\alpha$  pueden contribuir a la protección celular, pero cantidades excesivas pueden causar daño celular. La acumulación del ARNm para TNF- $\alpha$  que ocurre en células infectadas puede resultar en el incremento tanto de la transcripción como de la estabilización de la transcripción. Un aumento en la producción de TNF- $\alpha$  por células polimorfonucleares ha sido observado en una hepatitis viral fulminante y en hepatitis crónica B y C (Larrea, E y col. 1996).

\*\*\*\*\*

*Interferón  $\gamma$* 

El interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) es producido por células CD8, NK y linfocitos T4 durante procesos infecciosos (DeMaeyer, E y col. 1998) y ha sido documentado su efecto antiviral (Sakaida, I y col. 1998) y antiparasitario así como sus propiedades inmunomoduladoras. Es inducido por varios antígenos y mitógenos; su producción es solamente después de que las células T han sido sensibilizadas por antígenos virales y aunque su función reside en la activación de reacciones inmunes, también puede ejercer sus efectos antivirales directamente y contribuir a la defensa del huésped (DeMaeyer, E y col. 1998).

Se ha descrito que el interferón tiene efectos antifibrogénicos (Castilla, A y col. 1991); sin embargo, no se conoce aún si el IFN- $\gamma$  tiene un efecto directo sobre la célula productora de colágena o si su efecto está mediado vía la inhibición de la replicación viral limitando de esta forma la respuesta inmunológica que condiciona a la muerte celular y la liberación de citocinas fibrogénicas de manera persistente. Hay reportes de que el IFN- $\gamma$  previene la fibrosis en el hígado por la inhibición de la activación y proliferación de las células estelares, resultando en una reducción de la expresión del ARNm de procolágena (Sakaida, I y col. 1998).

\*\*\*\*\*

## 1.7.- TRATAMIENTO UTILIZADO

### 1.- Colchicina

La colchicina es un fármaco con actividad antifibrogénica (Mavier, P. 1995; Mallat, A. 1995) y antiinflamatoria. Es un alcaloide altamente activo que es extraído de la planta *Colchicum autumnale* (Critckley, J y col. 1997). La colchicina fue usada en el siglo VI por Alejandro de Tralles y desde 1764 ha sido utilizada para prevenir y tratar la gota (Naidus, RM y col. 1977).

La colchicina inhibe el ensamble de los microtúbulos, interfiere con el transporte y la secreción de la colágena (Kershenobich, D y col. 1979) [aunque todavía no se ha establecido bien su mecanismo de acción (Friedman, J. 1999)] e incrementa la producción de la colagenasa in vitro (Mavier, P y col. 1995).

Cuando se desarrollan sus efectos tóxicos, son usualmente reversibles y consisten en náuseas, diarrea y dolor abdominal. Los efectos tóxicos severos involucran al sistema hepático, hematopoyético y nervioso (Naidus, RM y col. 1977).

La colchicina puede prevenir la progresión de enfermedades crónicas del hígado, especialmente en pacientes con principios de cirrosis; esto sugiere que en los estados de la enfermedad crónica puede ser importante el tratamiento con colchicina ( Lee, MH y col. 1998).

### 2.- Pentoxifilina

La pentoxifilina (PTX) es un derivado de las metilxantinas (Lee, KS y col. 1997; Windmeier, C y col. 1997) inicialmente utilizadas en el tratamiento de la enfermedad vascular periférica por sus efectos sobre la deformación de la membrana eritrocitaria. Se conocen sus acciones inhibitorias sobre la adhesión y agregación plaquetaria, así como en la síntesis del fibrinógeno (Ward, A y col. 1987).

Tiene propiedades hepatoprotectoras, también inhibe la diferenciación de las células estelares a miofibroblastos y disminuye la síntesis y secreción de algunos componentes de la matriz (Lee, KS y col. 1997; Windmeier, C y col. 1997).

\*\*\*\*\*

Actúa como un potente agente antifibrogénico debido a que ejerce una inhibición en la proliferación celular (Preaun, AM y col. 1997) y/o almacenamiento de colágena en los tipos celulares responsables de la acumulación de la matriz extracelular (Romanelli, RG y col. 1997).

Los resultados clínicos más relevantes son los efectos terapéuticos en la atenuación de los efectos del TNF- $\alpha$  en condiciones de choque séptico (Windmeier, C y col. 1997). La PTX previene la formación de radicales superóxidos inducidos por el TNF- $\alpha$ , lo cual indica que puede actuar como secuestrador de radicales libres (Lee, K.S y col. 1997).

Estudios "in vitro" e "in vivo" han demostrado su capacidad inhibitoria sobre la síntesis del TNF- $\alpha$  en células mononucleares de sangre periférica tratadas con LPS (Reed, WR y col. 1992), reduciendo de manera significativa las consecuencias letales del choque séptico (Noel, P y col. 1990).

Se ha demostrado que la PTX previene los cambios químicos e histológicos en un modelo de cirrosis experimental (Peterson, TC y col. 1993) y que es capaz de disminuir la liberación de algunas citocinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en células mononucleares periféricas de voluntarios sanos (Neuner, P y col. 1994).

Se sugiere que la inhibición de la actividad de las células estelares hepáticas (HSC) por la PTX resulta del bloqueo de la cascada de stress oxidativo dentro de estas células (Lee, KS y col. 1997).

### 3.- Interferón- $\alpha$

El interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) fue el primero en ser reportado que tenía efectos beneficiosos en la hepatitis C crónica a mediados de los años 80's. Este agente fue aprobado para su uso en la terapia contra la hepatitis crónica en 1991 (Conjeevaram, H y col. 1995). Es producido por los monocitos y líneas de células B transformadas, de forma específica, en respuesta a estímulos virales. Ha mostrado tener propiedades antifibrogénicas (Angélico, M y col. 1998). La terapia con este interferón induce una respuesta en los pacientes con hepatitis crónica (Bellabuono, A y col. 1998).

Se ha demostrado que el IFN- $\alpha$  inhibe la expresión de colágena de tipo I y del TGF- $\beta$ , tanto en animales de experimentación como en pacientes con cirrosis hepática de etiología viral, efectos que parecen ser independientes de

\*\*\*\*\*

la inhibición de la replicación viral (Castilla, A y col. 1991). Recientemente, se ha mostrado que el IFN- $\alpha$  inhibe la síntesis de colágena en células estelares *in vitro* (Sakaida, I y col. 1998).

El IFN- $\alpha$  tiene acciones antivirales al disminuir la entrada del virus a las células, al evitar la opsonización de los antígenos virales, al disminuir la síntesis de ARNm viral, al disminuir la síntesis de proteínas virales y al prevenir la liberación de los viriones de las células infectadas (Zein, NN. 1998).

\*\*\*\*\*

## 2.- JUSTIFICACION

La respuesta del hígado al daño por el virus se establece a través de una serie de eventos fisiológicos y bioquímicos tales como la síntesis de factores de crecimiento y de citocinas, diseñados para restablecer la integridad del hígado. El incremento en la producción de estas citocinas da lugar a la fibrogénesis, que es un proceso dinámico que resulta en la acumulación de proteínas extracelulares que conforman la cicatriz del hígado, constituida a su vez por fibras de colágena de tipo I y III entre otros componentes. La fibrosis, con el paso del tiempo, da lugar a la cirrosis, la cual se caracteriza por el incremento en los componentes de la matriz extracelular y la activación de las células estelares.

Para evitar que se presente la fibrosis es importante conocer cual es el mecanismo de acción de los fármacos antifibrogénicos (Colchicina, Pentoxifilina e Interferón- $\alpha$ ) sobre la expresión y secreción de las citocinas para así desarrollar medidas terapéuticas que disminuyan la tasa de mortalidad y mejoren la calidad de vida de los enfermos con hepatitis C y cirrosis.

\*\*\*\*\*

### 3.- OBJETIVOS

#### GENERAL

Estudiar el mecanismo de acción de tres fármacos de acción antifibrogénica: la colchicina, la pentoxifilina y el interferón- $\alpha$ .

#### PARTICULAR

Realizar un análisis "in vivo" de los efectos de la colchicina, la pentoxifilina y el interferón- $\alpha$  sobre la expresión y secreción de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-8 e IFN- $\gamma$ ) y factores de crecimiento (TNF- $\alpha$ ) en linfocitos de pacientes a diferentes periodos del tratamiento.

Correlacionar la carga viral de los pacientes en el tiempo inicial y a los dos meses del tratamiento con la expresión y secreción de las citocinas.

#### HIPOTESIS

La colchicina, la pentoxifilina y el interferón- $\alpha$  disminuyen la expresión y secreción de las citocinas fibrogénicas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) quimiotácticas (IL-8) y antiinflamatorias (IFN- $\gamma$ ) en linfocitos de pacientes a diferentes periodos del tratamiento.

COORDINACIÓN DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

\*\*\*\*\*

## 4.- MATERIAL Y METODO

### 4.1.- MUESTRA

Se estudiaron 25 pacientes de ambos sexos y edades comprendidas entre los 26 y 63 años con antecedentes de infección por virus de la hepatitis C y fueron distribuidos de la siguiente manera:

*Grupo A:* Se incluyeron 10 pacientes con antecedente de transfusión sanguínea previa y anticuerpos positivos contra el virus de la hepatitis C por el método de ELISA de segunda generación y con diagnóstico establecido de cirrosis hepática en estadio A de Child.

*Criterios de exclusión:*

- Antecedentes de alcoholismo crónico con consumo de más de 30g de etanol en promedio al día.
- Seropositividad para HBsAg, HBcAg ó HBcAb.
- Evidencia de hepatopatía de otra etiología (basada en historia clínica, histopatología y marcadores inmunológicos).

*Grupo B:* Se incluyeron 15 pacientes con antecedente de transfusión sanguínea previa y anticuerpos positivos contra el virus de la hepatitis C que presentaban alteración de las pruebas de función hepática (PFH) y evidencia en la biopsia de cualquier lesión histológica, exceptuando cirrosis.

*Criterios de exclusión:*

- Seropositividad para HBsAg, HBcAg ó HBcAb.
- Evidencia de seropositividad para marcadores inmunológicos predisponentes de enfermedad hepática.
- Cirrosis hepática.

*Criterios de exclusión para los dos grupos:*

- Ingesta de alcohol en las 4 semanas previas.
- Antecedentes de transfusión en las 8 semanas previas.
- Tratamiento antifibrogénico, antiviral o inmunomodulador previo.
- Tratamiento en los 4 meses previos con agentes antiinflamatorios 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.
- Presencia de enfermedad tumoral maligna a cualquier nivel.
- Proceso infeccioso o inflamatorio a otro nivel.
- Falta de consentimiento escrito.

## 4.2.- METODOLOGIA

En cada grupo, los pacientes recibieron en forma aleatoria: colchicina (5 mg/sem), pentoxifilina (2800mg/sem) ó interferón- $\alpha$  (9 MU/sem por vía subcutánea). El tratamiento fue administrado por un año.

Todos los estudios fueron realizados de manera ciega en cuanto a grupo de origen del paciente y tratamiento recibido. Para obtener resultados evaluables, los pacientes debieron haber completado cuando menos dos meses de tratamiento.

Se tomaron muestras a los pacientes en el tiempo de inicio y a los 2, 6 y 12 meses de tratamiento.

## 4.3.- CUANTIFICACION DE LA CARGA VIRAL

Para cuantificar la carga viral se utilizó el kit Quantiplex HCV RNA 2.0 Assay (bDNA) (Chiron diagnostics).

Las muestras de plasma fueron descongeladas con hielo y agua y después se siguieron las indicaciones del kit.

Se utilizaron solo el tiempo 0 y 2 meses debido a que en este lapso de tiempo se esperaba una respuesta del fármaco.

*La sensibilidad del kit es de 0.2 mEq/ml de RNA VHC.*

\*\*\*\*\*

#### **4.4. - OBTENCION DE LINFOCITOS**

Se tomó una muestra de sangre de los pacientes en cada uno de los tiempos propuestos. Los linfocitos se obtuvieron por gradiente de centrifugación utilizando Linfocrad ó Ficoll-Hypaque y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos. Después se extrajo la banda de linfocitos (interfase) y se lavaron con PBS (2 o 3 veces).

Se tomó  $1 \times 10^6$  células y se cultivaron en cajas de Petri con medio RPMI 1640 conteniendo 10% FCS a 37°C durante 24h. Se obtuvo el sobrenadante y en él se cuantificó la secreción de las citocinas.

La expresión de las citocinas fue medida en los linfocitos restantes y la carga viral fue cuantificada en el plasma de los pacientes.

#### **4.5. - DETERMINACION DE CITOCINAS**

Las citocinas que se determinaron fueron IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

La expresión de las citocinas fue obtenida utilizando la técnica de transcriptasa reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la secreción se obtuvo utilizando estuches inmunoenzimáticos específicos.

#### **4.6. - EXTRACCION DE ARN**

Para la extracción de ARN se utilizó la técnica modificada de Chomczynski (1987). Al tubo que contenía el botón de los linfocitos se le adicionó 1 ml de solución desnaturalizante conteniendo 10 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, se resuspendieron y se colocaron en tubos de 1.5 ml, se le adicionó acetato de sodio 2M pH 4.8 y se agitó por inversión, después se adicionó fenol saturado caliente (50°-60°C) y se agitó por inversión, finalmente se adicionó cloroformo-isoamílico (24:1) y se agitó por inversión. Se dejó incubar 10 min a 4°C, pasado el tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C, concluido el tiempo, se tomó la fase superior y se transfirió a un tubo de 1.5 ml frío, se adicionó NaCl 4M y etanol al 95% frío. Se dejó precipitar 24 h. Se centrifugó 30 min a 14,000 rpm a 4°C, se retiró el sobrenadante, se adicionó etanol al 70% y se centrifugó nuevamente durante 10 min a 14,000 rpm a 4°C, después se extrajo el sobrenadante con una pipeta Pasteur con punta fina y el botón obtenido se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua DEPC. Se

\*\*\*\*\*

resuspendió totalmente y se tomaron 2  $\mu$ l para la cuantificación de ARN. La muestra restante se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

El ARN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Beckman. Los 2 $\mu$ l del ARN se colocaron en 498 $\mu$ l de agua DEPC, para tener así una dilución 1:250. La concentración se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$[ \quad ] = \text{Ab}_{260} \times \text{dilución} \times \text{factor} = \text{Ab}_{260} \times 250 \times 0.04 = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

#### 4.7.- DETERMINACION de la EXPRESION de las CITOCINAS

La transcripción de los genes de las diferentes citocinas se cuantificó en presencia de un control interno poliespecífico (plásmido pQA-1) mediante la reacción de la transcriptasa reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Transcriptasa reversa:** La reacción de transcriptasa reversa se llevó a cabo con mezclas del ARN obtenido y el ARN estándar del plásmido pQA-1.

Se tomaron 2 $\mu$ l del ARN y se colocaron en un tubo para PCR. El ARN fue desnaturalizado durante 5 min a  $70^{\circ}\text{C}$  y enfriado rápidamente en hielo. Posteriormente se agregaron 100ng de oligonucleótido iniciador (Oligo d(T)), 50U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (Gibco-BRL) y 0.5 M de cada uno de los 4 desoxinucleótidos trifosfato (Gibco-BRL) en volumen final de 20 $\mu$ l. La reacción se llevó a cabo durante 60 min a  $42^{\circ}\text{C}$  seguida de 5 min a  $95^{\circ}\text{C}$  en un termociclador programado (Perkin-Elmer Co, Norwalk, CT, EUA).

Como parámetro de comparación inter e intraensayo se utilizó el plásmido pQA-1 para la cuantificación de la proteína estructural  $\beta_2$ -microglobulina.

**Reacción en cadena de la polimerasa:** El producto de la reacción de transcriptasa reversa fue dividido en dos partes. El ADNc se mezcló con 30pM de cada uno de los iniciadores sentido y antisentido para las distintas citocinas, 0.5M de desoxinucleótidos trifosfato y 2U de TaqDNA polimerasa (Perkin-Elmer). Las condiciones de amplificación fueron de 1 ciclo a  $94^{\circ}\text{C}$  por

\*\*\*\*\*

5 min, 57°C por 1 min y 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos ( 94°C por 1 min, 57°C por 1 min y 72°C por 5 min), finalmente un ciclo de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min y 72°C por 5 min, todo esto en un termociclador programado. Los productos amplificados se corrieron en electroforesis en geles de agarosa al 1% con 0.05µg/ml de bromuro de etidio y fueron fotografiados sobre un transiluminador de luz UV con película Polaroid.

#### Los primers utilizados fueron:

IL-1β	sense 5' GGATATGGAGCAACAAGTGG 3'	
	antisense 5' ATGTACCAGTTGGGGAAGTGG 3'	263 pb
IL-8	sense 5' TTGCAGCCTTCCTGATT 3'	
	antisense 5' AACTTCTCCACAACCCTCTG 3'	247 pb
TNF-α	sense 5' ACAAGCCTGTAGCCCATGTT 3'	
	antisense 5' AAAGTAGACCTGCCAGACT 3'	427 pb
IFN-γ	sense 5' GCAGAGCCAAATTGTCTCCT 3'	
	antisense 5' ATGCTCTTCGACCTCGAAAC 3'	290 pb
β <sub>2</sub> µ glob	sense 5' CCAGCAGAGAATGGAAAGTC 3'	
	antisense 5' GATGCTGCTTACATGTCTCG 3'	268 pb

Todos estas citocinas están incluidas en el plásmido pQA-1 (humano), el cual es un control interno y tienen un peso molecular de 370 pb.

**Control interno de ARN:** El ARN que se empleó como control interno se sintetizó a partir del plásmido pQA-1 (amablemente proporcionada por el Dr. David Shire, Sanofi Elf Bio Recherches, Labège, Francia).(Shire, D. 1993). Primeramente el plásmido pQA-1 fue linearizado con 10U de la endonucleasa de restricción Eco R1 durante 60 min a 33°C.

\*\*\*\*\*

Posteriormente se verificó la ruptura del plásmido por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en solución 0.05X de tris-boratos-EDTA y 0.05µg/ml de bromuro de etidio. Una vez linearizado, se construyó una ribosonda con 400ng del plásmido mediante la acción de 50U de la enzima T7 ARN polimerasa, en presencia de 2.5mM de cada uno de los 4 nucleótidos trifosfato y 40U de inhibidor de ARNsa. Después de incubar por 60 min a 37°C, se agregaron 32U de ADNsa y el ARN se purificó secuencialmente con fenol y cloroformo : alcohol isoamílico. Por último, el ARN obtenido se precipitó con etanol. La pureza se verificó en un gel de agarosa al 1% con formaldehído y 0.05µg/ml de bromuro de etidio. La ribosonda o ARN estándar se cuantificó también por el método antes descrito.

#### 4.8.- DETERMINACION de la SECRECION de las CITOCINAS

La secreción de las citocinas se realizó con un estuche inmunoenzimático ELISA.

Las muestras de plasma fueron descongeladas y después se siguieron las indicaciones del kit.

La sensibilidad fue de: 1 pg/ml para IL-1β; 10 pg/ml para IL-8; 4.4 pg/ml para TNF-α y 3 pg/ml para INF-γ.

\*\*\*\*\*

## 4.9.- ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, la prueba de Friedman y la correlación de Spearman.

### *Prueba de Kruskal-Wallis*

El análisis de varianza de una clasificación por rangos de *Kruskal-Wallis* es una prueba extremadamente útil para decidir si  $x$  muestras independientes son de poblaciones diferentes. Los valores de las muestras, casi invariablemente, difieren un poco y la cuestión radica en que las diferencias entre las muestras signifiquen diferencias genuinas de poblaciones o simple variaciones aleatorias, semejantes a las esperadas entre distintas muestras aleatorizadas de la misma población.

Esta prueba examina la hipótesis de nulidad que supone que las  $x$  muestras proceden de la misma población o de poblaciones idénticas.

Con esta prueba se compararon las medianas de los dos grupos de pacientes (hepatitis y cirrosis) para descartar la hipótesis de que los dos grupos fueran iguales.

### *Prueba de rangos de Friedman*

La prueba de rangos de Friedman es útil para probar la hipótesis de nulidad de que las  $k$  muestras han sido sacadas de la misma población. Para esta prueba, los datos se colocan en una tabla de dos clasificaciones con  $N$  hileras y  $k$  columnas. Las hileras representan a los diferentes sujetos o conjuntos de sujetos igualados y las columnas representan las diferentes condiciones. Los datos de las pruebas son rangos. La prueba de Friedman determina la probabilidad de que las diferentes columnas de rangos procedan de la misma población.

Con esta prueba se compararon los valores obtenidos a los diferentes tiempos para descartar que pertenecieran al mismo tiempo.

\*\*\*\*\*

*Coefficiente de correlación de rango de Spearman:  $r_s$*

El índice de correlación de rango de Spearman es una medida de asociación que requiere que ambas variables sean medidas por lo menos en una escala ordinal, de manera que los objetos o individuos en estudio puedan colocarse en dos series ordenadas.

Con esta prueba se correlacionaron los valores obtenidos de la carga viral y de ambas transaminasas con la expresión y secreción de las diferentes citocinas.

*Prueba de la significancia de  $r_s$*

Si los sujetos cuyos puntajes se usaron al calcular  $r_s$  fueron tomados al azar de una población, podemos usar sus puntajes para determinar si las dos variables están asociadas en la población para examinar la hipótesis de nulidad que supone que las dos variables en estudio *no* están asociadas en la población y que la diferencia de cero del valor observado de  $r_s$  se debe solamente al azar.

Con esta prueba se compararon los valores de las medianas para ver si hay una correlación entre los valores obtenidos a los diferentes tiempos.

\*\*\*\*\*

## 5.- RESULTADOS

Se estudió un total de 25 pacientes con anticuerpos anti-VHC positivos (VHC +), 20 mujeres y 5 hombres, de los cuales, 15 presentaron hepatitis y 10 cirrosis.

Los pacientes fueron distribuidos de forma aleatoria para recibir el fármaco. De los pacientes con hepatitis: 5 recibieron colchicina (5 mg/semana durante un año), 6 pentoxifilina (2800 mg/semana durante un año) y 4 Interferón- $\alpha$  (9 MU/semana durante un año). En cuanto a los pacientes con cirrosis: 3 recibieron colchicina, 4 pentoxifilina y 3 interferón- $\alpha$ , a las mismas dosis y duración.

### 5.1.- ALT y AST

La tabla 1 muestra los valores de ALT que presentaron los pacientes incluidos en este trabajo a los diferentes tiempos de seguimiento. Se puede observar que los valores varían de acuerdo con la lesión hepática y el tratamiento administrado.

Tabla 1

Distribución de los valores de ALT (U.I./l) por tratamiento, tipo de lesión y tiempo de seguimiento.

GRUPO	n	0 Meses	2 Meses	6 Meses	12 Meses
Colchicina					
Hepatitis	5	91 (32 – 152)	72 (29 – 542)	48 (29 – 309)	35 (28 – 278)
Cirrosis	3	96 (56 – 112)	93 (71 – 103)	93 (71 – 103)	56 (45 – 106)
Pentoxifilina					
Hepatitis	6	63.5 (30 – 119)	53 (22 – 119)	34 (11 – 60)	30.5 (19 – 60)
Cirrosis	4	126 (81 – 172)	73 (43 – 169)	76 (66 – 219)	85 (65 – 117)
Interferón- $\alpha$					
Hepatitis	4	51.5 (21 – 70)	38.5 (23 – 133)	39 (13 – 85)	69.5 (17 – 127)
Cirrosis *	3	160 (124 – 195)	144 (48 – 205)	82 (21 – 108)	82 (37 – 116)

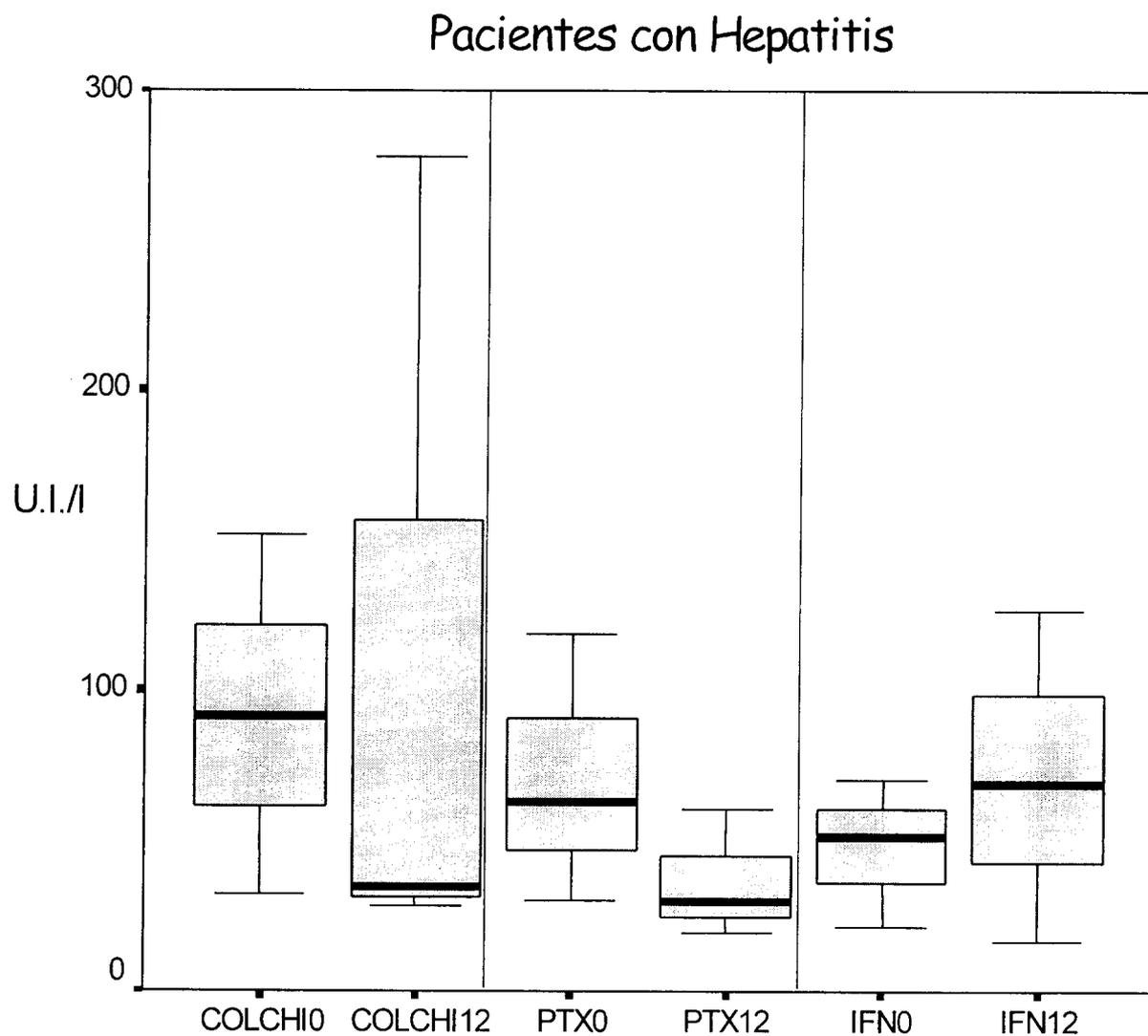
• Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)

• \* p = 0.047

Todos los pacientes presentaron una disminución en los valores de ALT, siendo significativa en los pacientes cirróticos que recibieron IFN- $\alpha$ .

\*\*\*\*\*

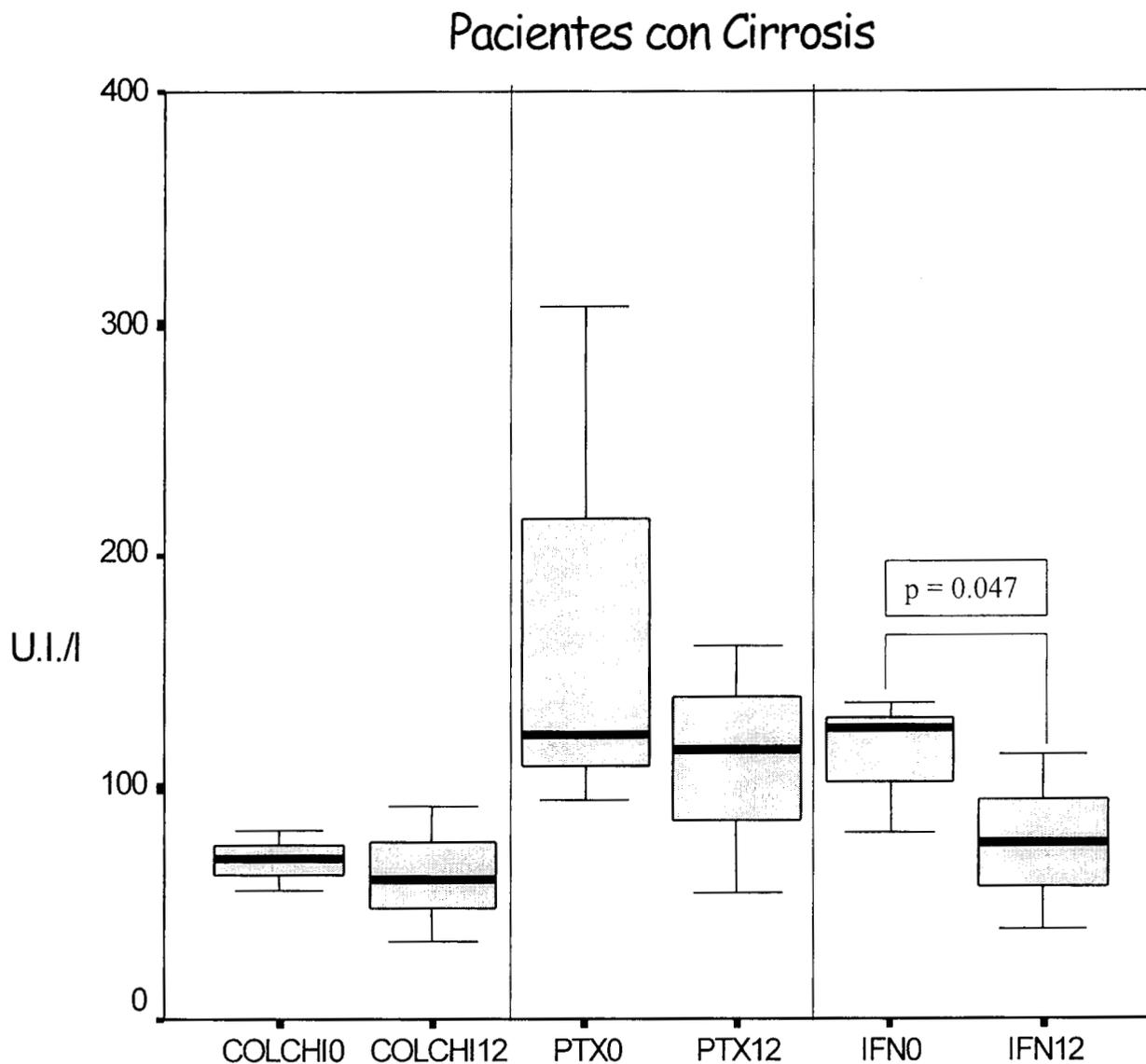
En la gráfica 1 se muestran en forma comparativa los valores de ALT (U.I./l) de los pacientes al tiempo 0 y 12 meses tratados con los diferentes fármacos y que presentaron hepatitis.



**Gráfica 1.-** Distribución de valores de ALT (U.I./l) de los pacientes con hepatitis después de 12 meses de tratamiento.

\*\*\*\*\*

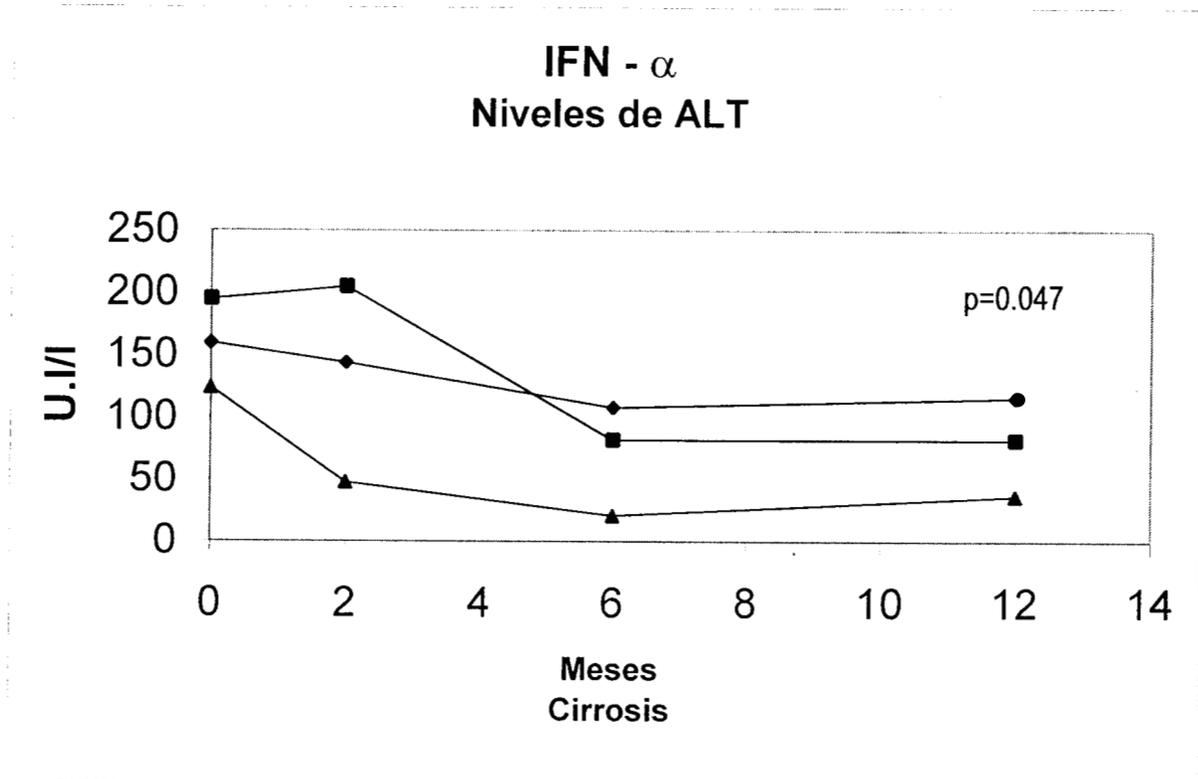
En la gráfica 2 se muestran en forma comparativa los valores de ALT (U.I./l) de los pacientes al tiempo 0 y 12 meses tratados con los diferentes fármacos y que presentaron cirrosis.



Gráfica 2.- Distribución de valores de ALT (U.I./l) de los pacientes con cirrosis después de 12 meses de tratamiento.

\*\*\*\*\*

El decremento en los valores de ALT fue consistente en todos y cada uno de los pacientes cirróticos, llegando a su estabilización al cabo de 6 meses del tratamiento (Gráfica 3).



Gráfica 3.- Distribución de los valores de ALT (U.I./l) en pacientes con cirrosis tratados con IFN- $\alpha$ .

\*\*\*\*\*

La tabla 2 muestra los valores de AST que presentaron los pacientes a los diferentes tiempos de seguimiento. Los valores varían de acuerdo a la lesión hepática presente y al tratamiento administrado.

Tabla 2

Distribución de valores de AST ( U.I / l ) por tratamiento, tipo de lesión y tiempo de seguimiento.

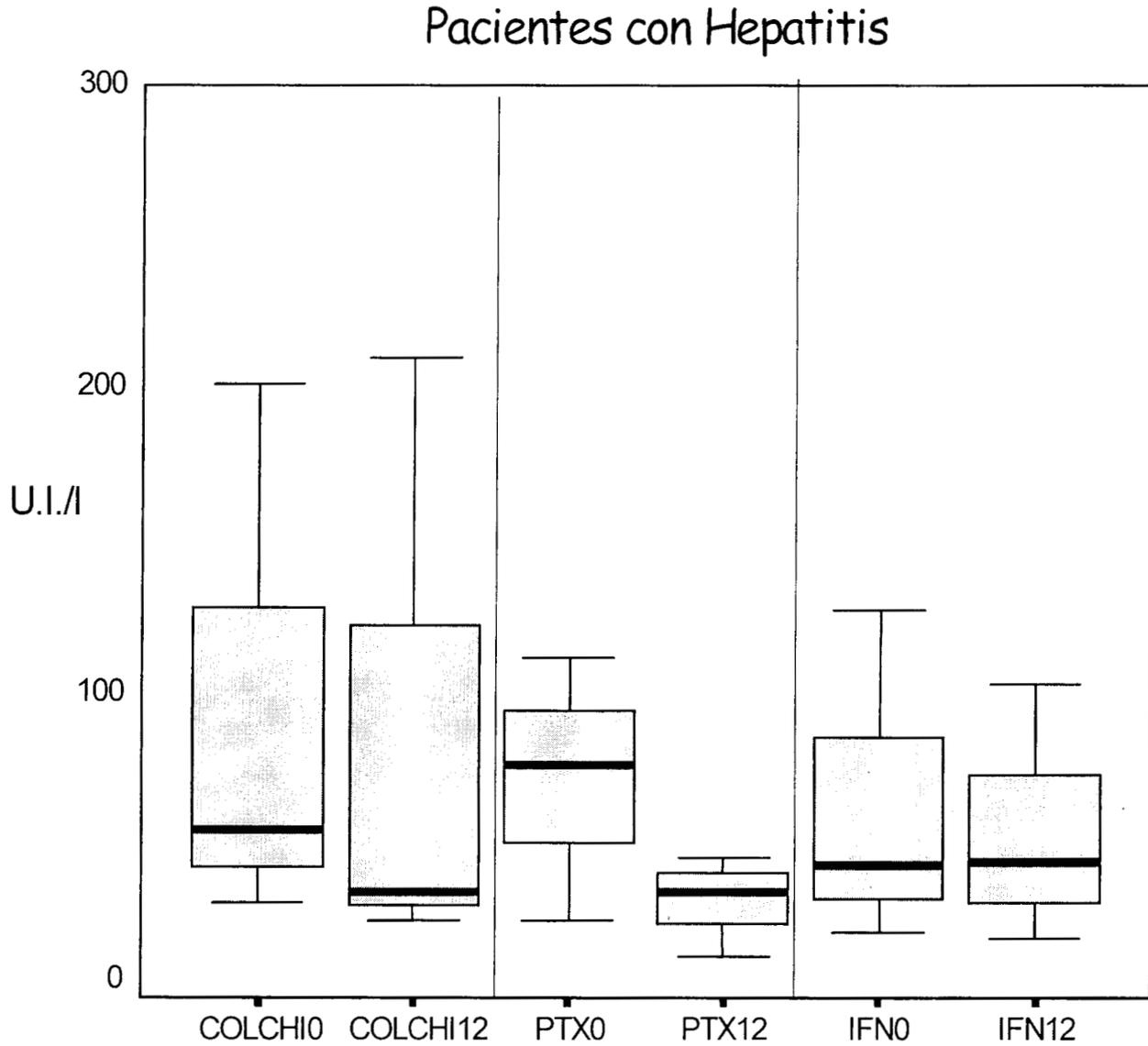
GRUPO	n	0 Meses	2 Meses	6 Meses	12 Meses
Colchicina					
Hepatitis	5	55 (31 – 202)	48 (35 – 256)	39 (31 – 319)	35 (25 – 210)
Cirrosis	3	69 (56 – 82)	77 (67 – 86)	77 (67 – 86)	61 (34 – 92)
Pentoxifilina					
Hepatitis	6	76.5 ( 25 – 112)	53.5 (20 – 211)	42.5 (14 – 56)	35.5 (14 – 46)
Cirrosis	4	123.5 (95 – 308)	96 (35 – 309)	95.5 (70 – 118)	116.5 (55 – 161)
Interferón- $\alpha$					
Hepatitis	4	43.5 (21 – 128)	35.5 (24 – 120)	32.5 (20 – 72)	44 (19 – 103)
Cirrosis *	3	125 (81 – 136)	113 (42 – 173)	76 (35 – 108)	76 (39 – 114)

- Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)
- \* p =0.089

Todos los pacientes presentaron una disminución en los valores de AST al término del tratamiento y sólo los pacientes con cirrosis tratados con IFN- $\alpha$  alcanzaron una disminución con tendencia significativa.

\*\*\*\*\*

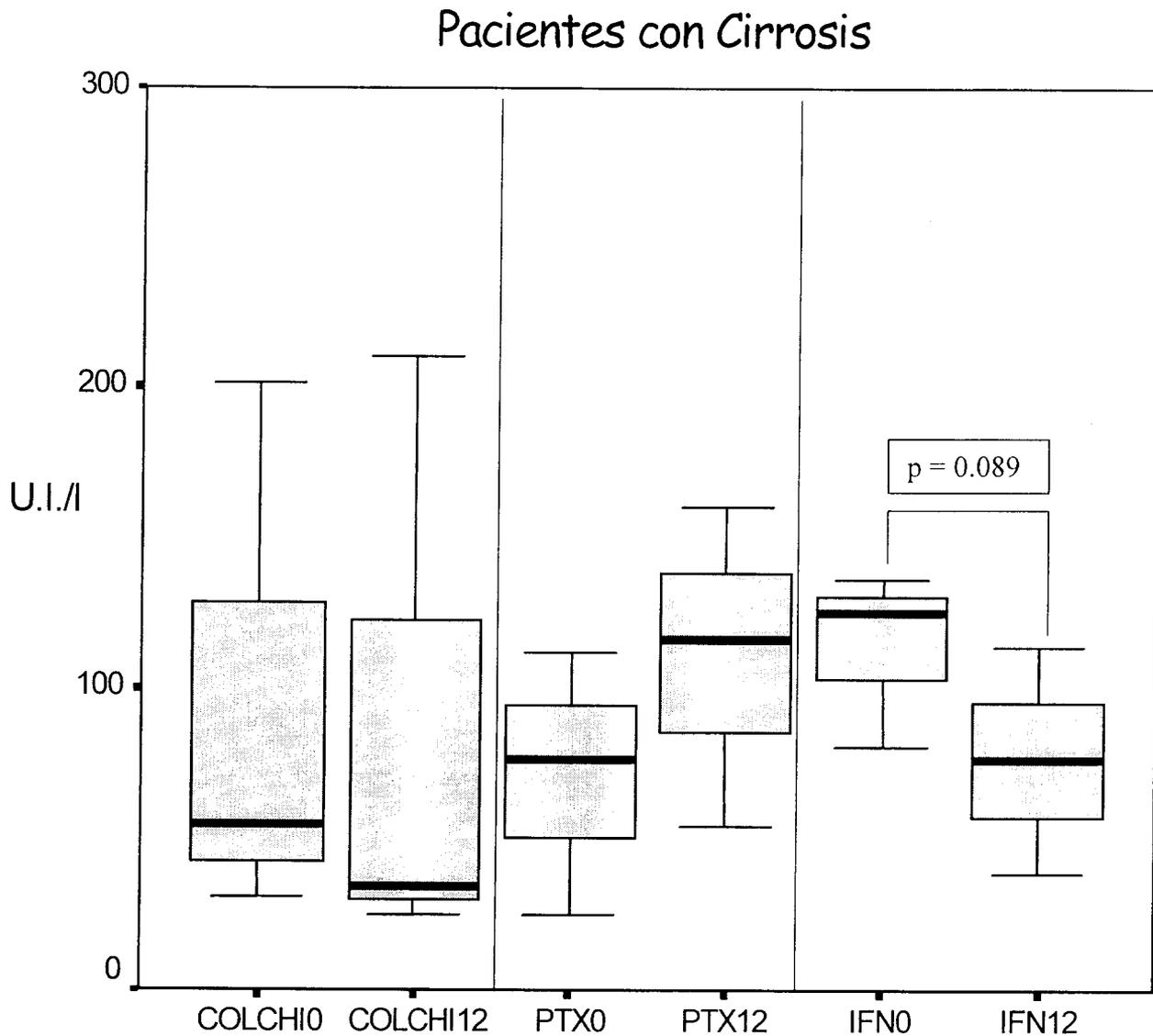
En la gráfica 4 se muestran en forma comparativa los valores de AST (U.I./l) de los pacientes al tiempo 0 y 12 meses tratados con los diferentes fármacos y que presentaron hepatitis.



**Gráfica 4.-** Distribución de los valores de AST (U.I./l) de los pacientes con hepatitis después de 12 meses de tratamiento.

\*\*\*\*\*

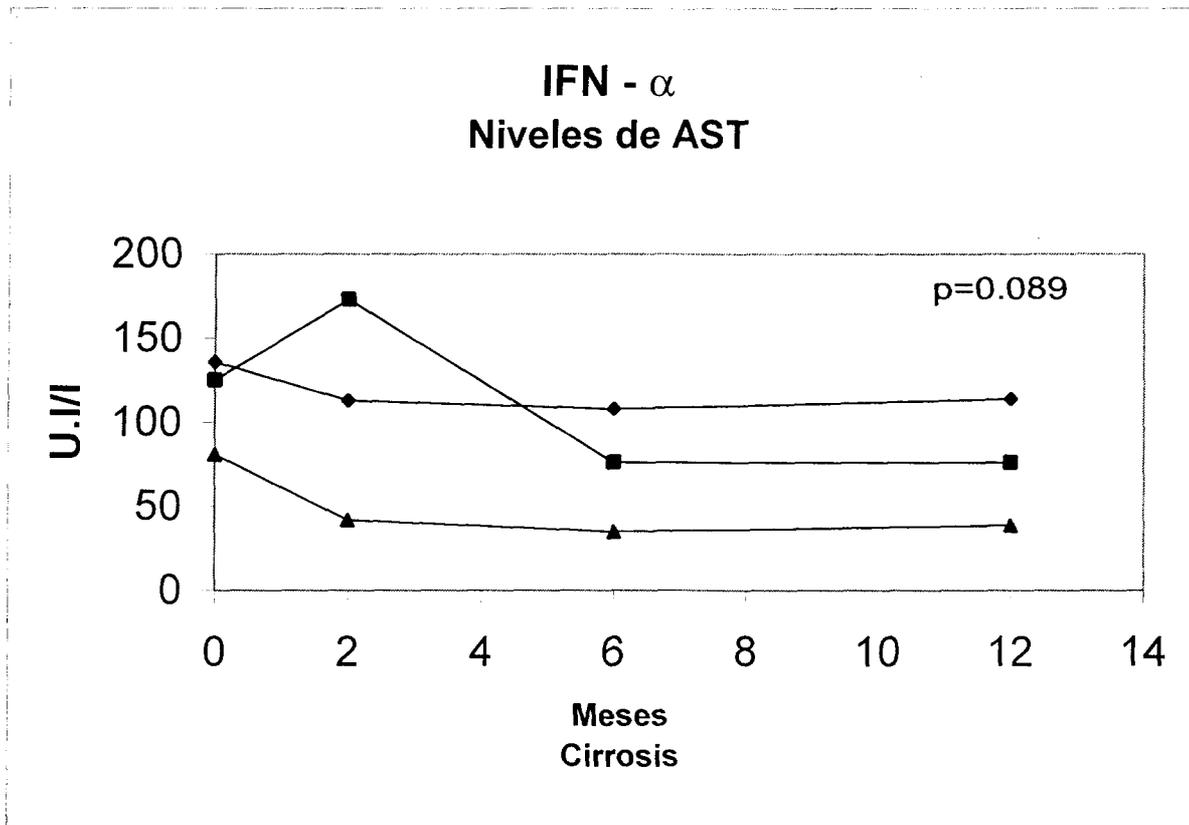
En la gráfica 5 se muestran en forma comparativa los valores de AST (U.I./l) de los pacientes al tiempo 0 y 12 meses tratados con los diferentes fármacos y que presentaron cirrosis.



Gráfica 5.- Distribución de los valores de AST (U.I./l) de los pacientes con cirrosis después de 12 meses de tratamiento.

\*\*\*\*\*

El decremento en los valores de AST fue consistente en todos y cada uno de los pacientes cirróticos, llegando a su estabilización al cabo de 6 meses de tratamiento (Gráfica 6).

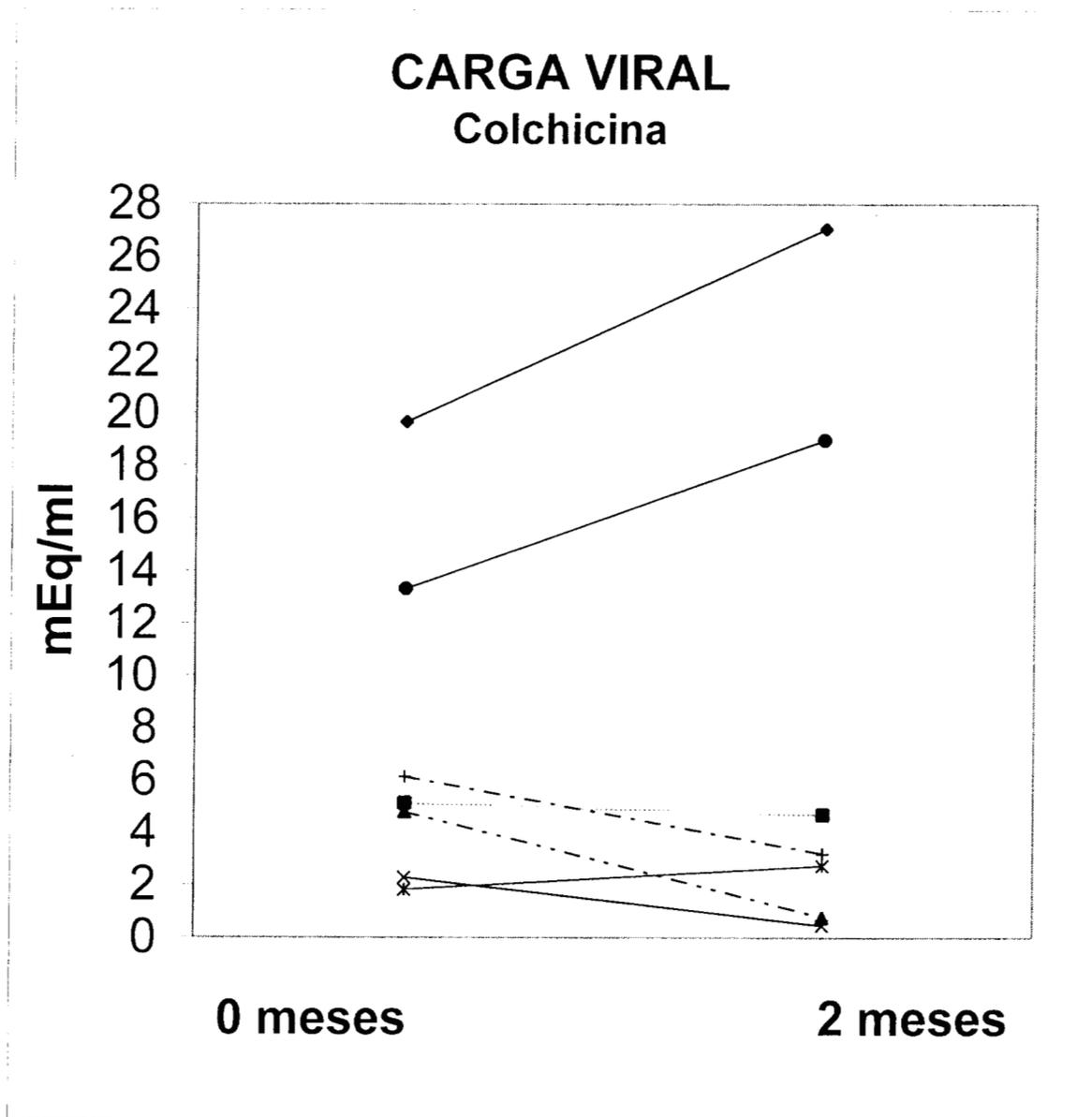


Gráfica 6.- Distribución de los valores de AST (U.I./l) en pacientes con cirrosis tratados con IFN-α.

\*\*\*\*\*

5.2.- CARGA VIRAL

En cuanto a la carga viral, 3 pacientes tratados con colchicina presentaron un incremento en los valores (Gráfica 7).

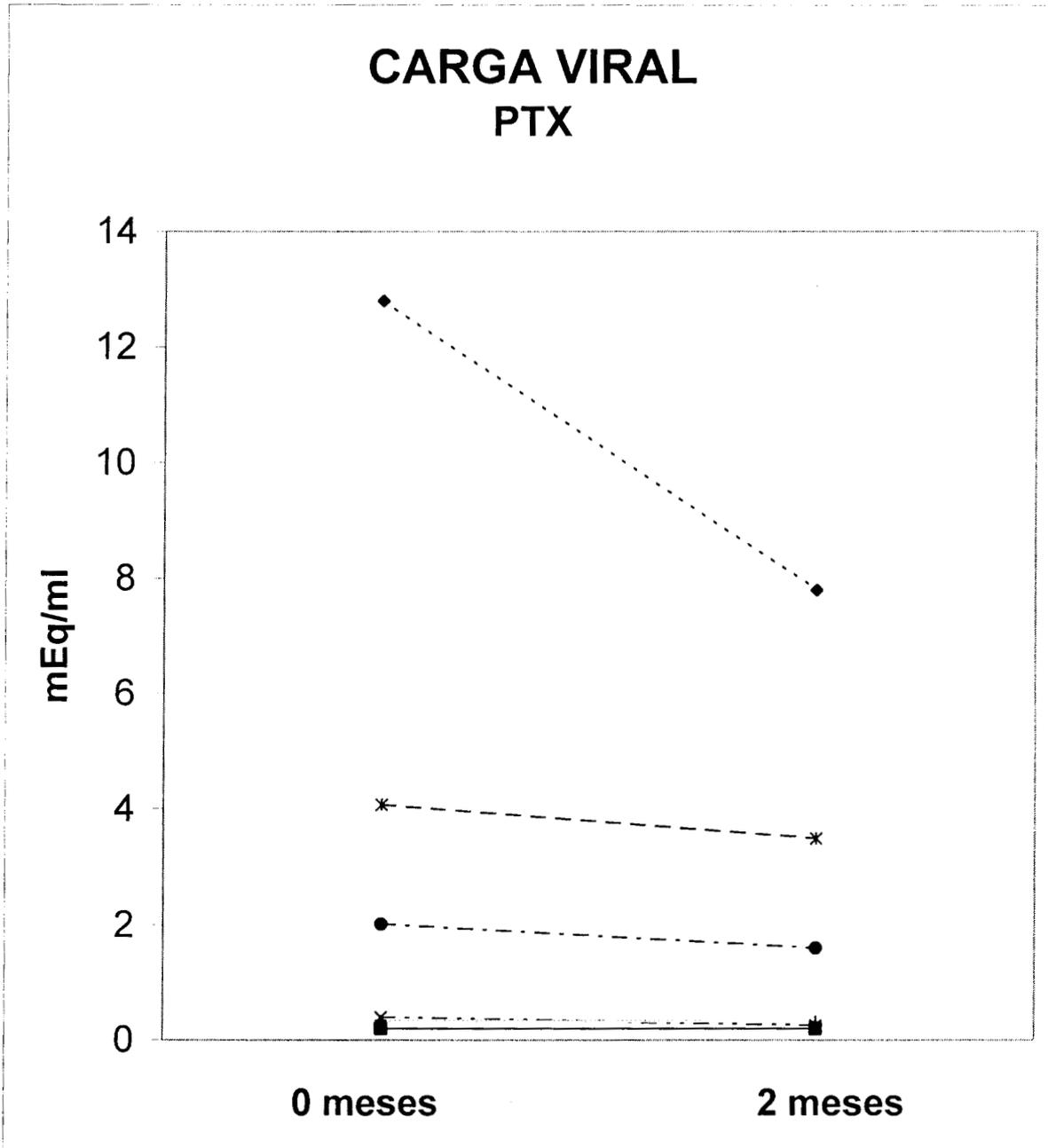


Gráfica 7.- Distribución de los valores de carga viral de los pacientes tratados con colchicina.

\*\*\*\*\*

227417

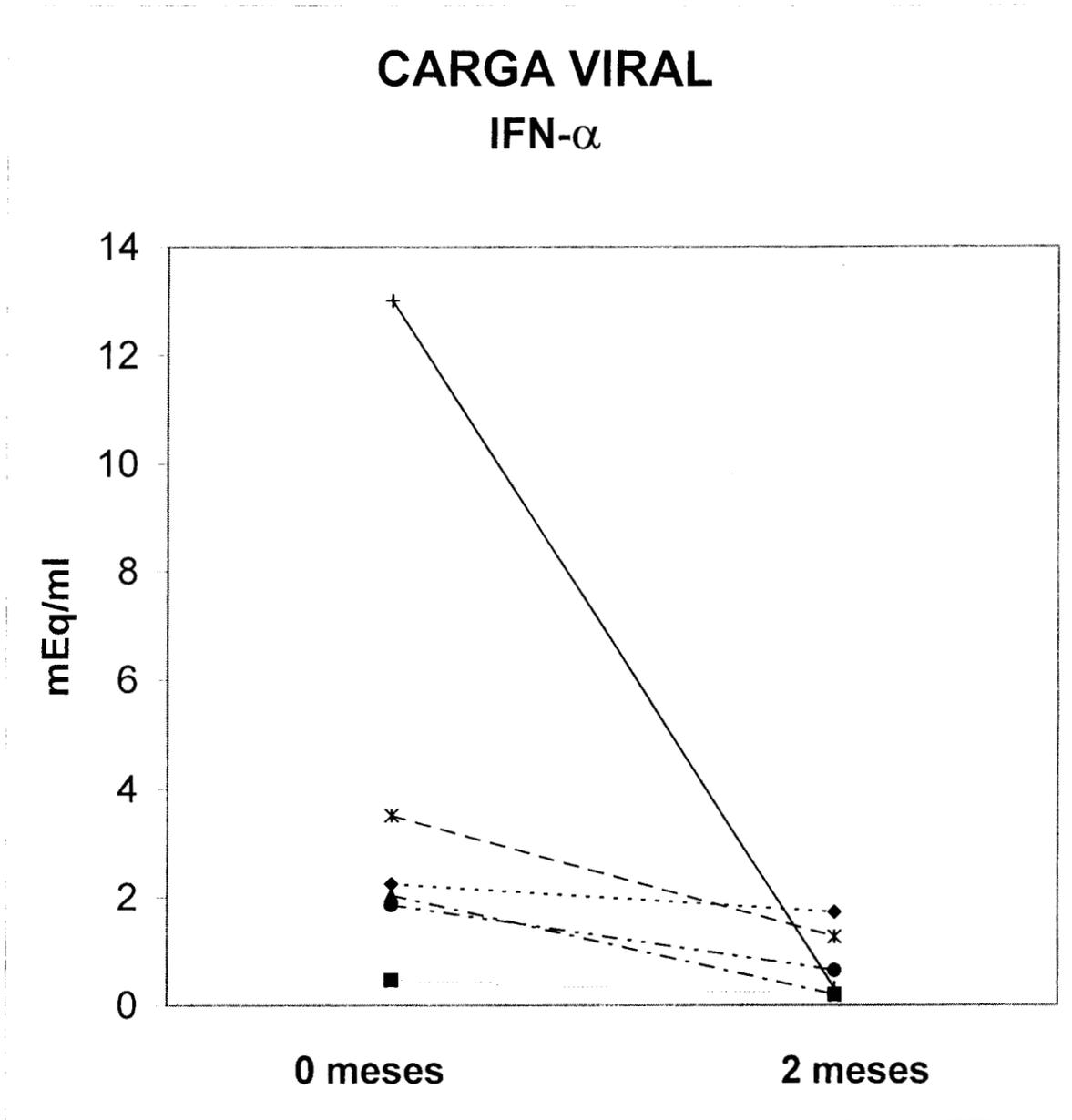
En cuanto a la carga viral de los pacientes a los que se les administró pentoxifilina, Se puede observar que 2 pacientes tienen valores negativos (< 0.2mEq/ml), 5 disminuyen sus valores y 1 permanece constante (Gráfica 8).



Gráfica 8.- Distribución de los valores de carga viral de pacientes que fueron tratados con PTX.

\*\*\*\*\*

En cuanto a la carga viral que presentaron los pacientes que fueron tratados con IFN- $\alpha$ . Se puede observar que 3 pacientes obtuvieron valores no detectables a los dos meses de tratamiento y que 4 presentaron una disminución de sus valores (Gráfica 9).



Gráfica 9.- Valores de la carga viral de los pacientes que recibieron IFN- $\alpha$ .

\*\*\*\*\*

### 5.3.- EXPRESION y SECRECION de IL-1 $\beta$

En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos de la expresión de la IL-1 $\beta$  de los pacientes a los diferentes tiempos de tratamiento. Se observa que aunque hay una disminución de la expresión al final del tratamiento, esta no es significativa debido a que los rangos que se obtuvieron son muy amplios.

Las correlaciones a los dos meses entre los valores de la carga viral y los valores de la expresión y secreción de esta citocina variaron de entre 0.301 a 0.605 y ninguna fue estadísticamente significativa.

Tabla 3

Distribución de los valores de la expresión de IL-1 $\beta$  (pg /ml ) por tratamiento, tipo de lesión y tiempo de seguimiento.

GRUPO	n	0 Meses	2 Meses	6 Meses	12 Meses
Colchicina					
Hepatitis	5	2.6 (2.5 – 750)	2.5 (0.36 – 46.87)	5.85 (0.36 – 780)	2.95 (0.36 – 750)
Cirrosis	3	46.87 (2.5 – 1630)	0.36 (0.36 – 1630)	0.36 (0.36 – 1630)	0.36 (0.36 – 2.92)
Pentoxifilina					
Hepatitis	6	2.53 (0.81 – 750)	0.58 (0.36 – 187.5)	14.12 (0.36 – 1635)	2.71 ( 0.36 – 750)
Cirrosis	4	185.7 (0.36 – 1900)	185.7 (0.36 – 1700)	4.82 (0.36 – 185.7)	0.36 (0.36 – 1.46)
Interferón- $\alpha$					
Hepatitis	4	2.53 (0.36 – 750)	750 (0.36 – 2500)	11.71 (0.36 – 1950)	0.36 (0.36 – 1.46)
Cirrosis	3	375 (4.45 – 765)	46.87 (23.43 – 750)	750 (5.85 – 1800)	3.61 (1.46 – 5.85)

- Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)

\*\*\*\*\*

En la tabla 4 se muestran los valores obtenidos de la secreción de la IL-1  $\beta$  de los pacientes a los diferentes tiempos de seguimiento. Se observa que hay cambios significativos en los valores obtenidos tanto en los pacientes con cirrosis tratados con colchicina y con IFN- $\alpha$ , al igual que en todos los pacientes tratados con PTX.

Tabla 4

Distribución de los valores de secreción de IL-1  $\beta$  ( pg / ml ) por tratamiento, tipo de lesión y tiempo de seguimiento.

GRUPO	n	0 Meses	2 Meses	6 Meses	12 Meses
Colchicina					
Hepatitis	5	459 (387 – 550)	507 (112 – 528)	349 (101 – 548)	424 (0 – 548)
Cirrosis *	3	539 (234 – 544)	544 (153 – 555)	544 (153 – 555)	228 (0 – 507)
Pentoxifilina					
Hepatitis **	6	1094.5 (789 – 1230)	1100.5 (738 – 1356)	991.5 (6 – 1148)	105 (0 – 1148)
Cirrosis ***	4	1282.5 (1005 – 1406)	1186.5 (1091 – 1278)	1117 (858 – 1278)	0 (0 – 58)
Interferón- $\alpha$					
Hepatitis****	4	540 (70 – 593)	92.5 (62 – 498)	75.5 (0 – 88)	0 (0 – 0)
Cirrosis	3	536 (407 – 581)	415 (411 – 544)	411 (28 – 415)	0 (0 – 28)

• Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)

• \* p = 0.080

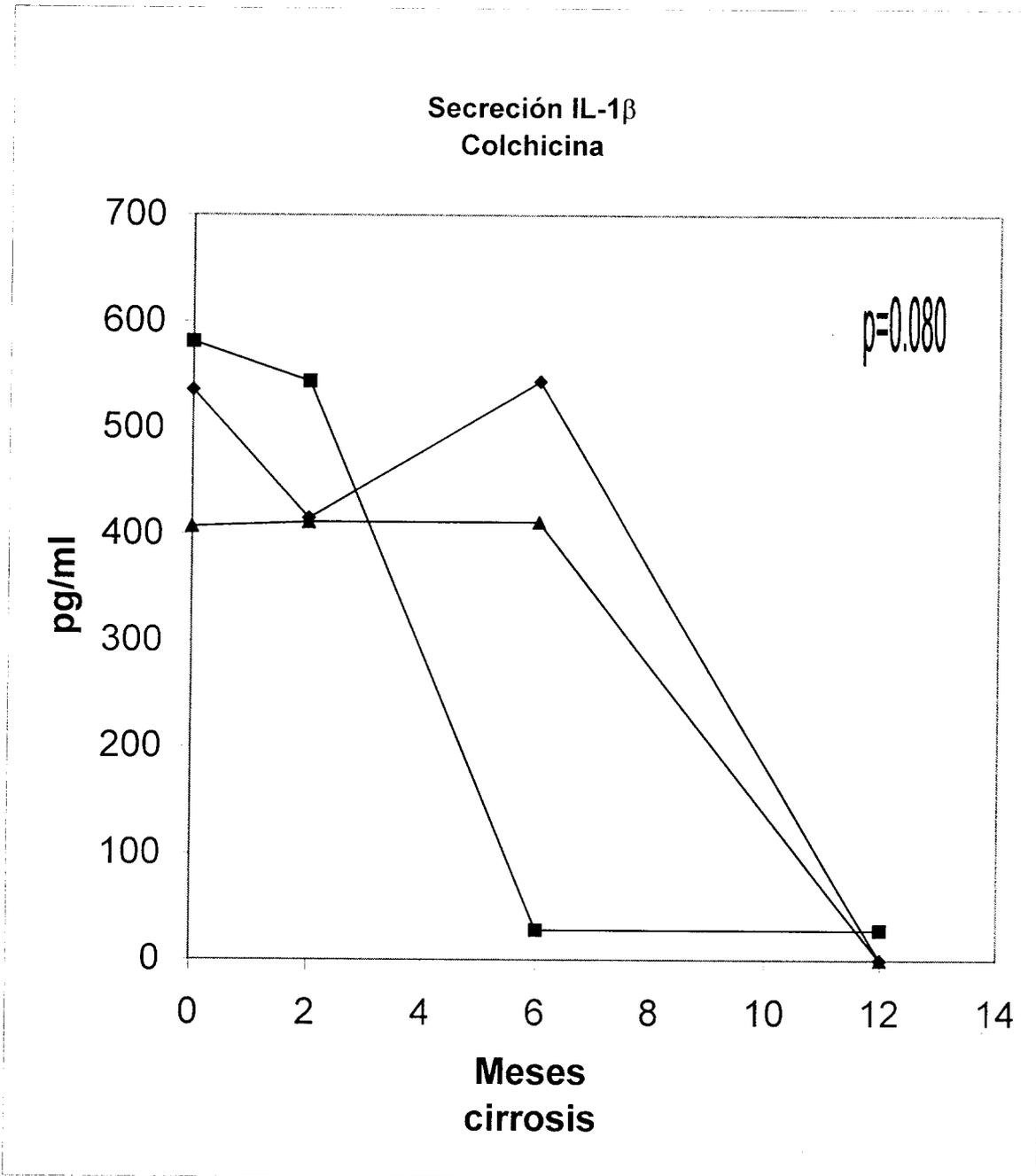
\*\* p = 0.060

\*\*\* p = 0.040

\*\*\*\* p = 0.034

\*\*\*\*\*

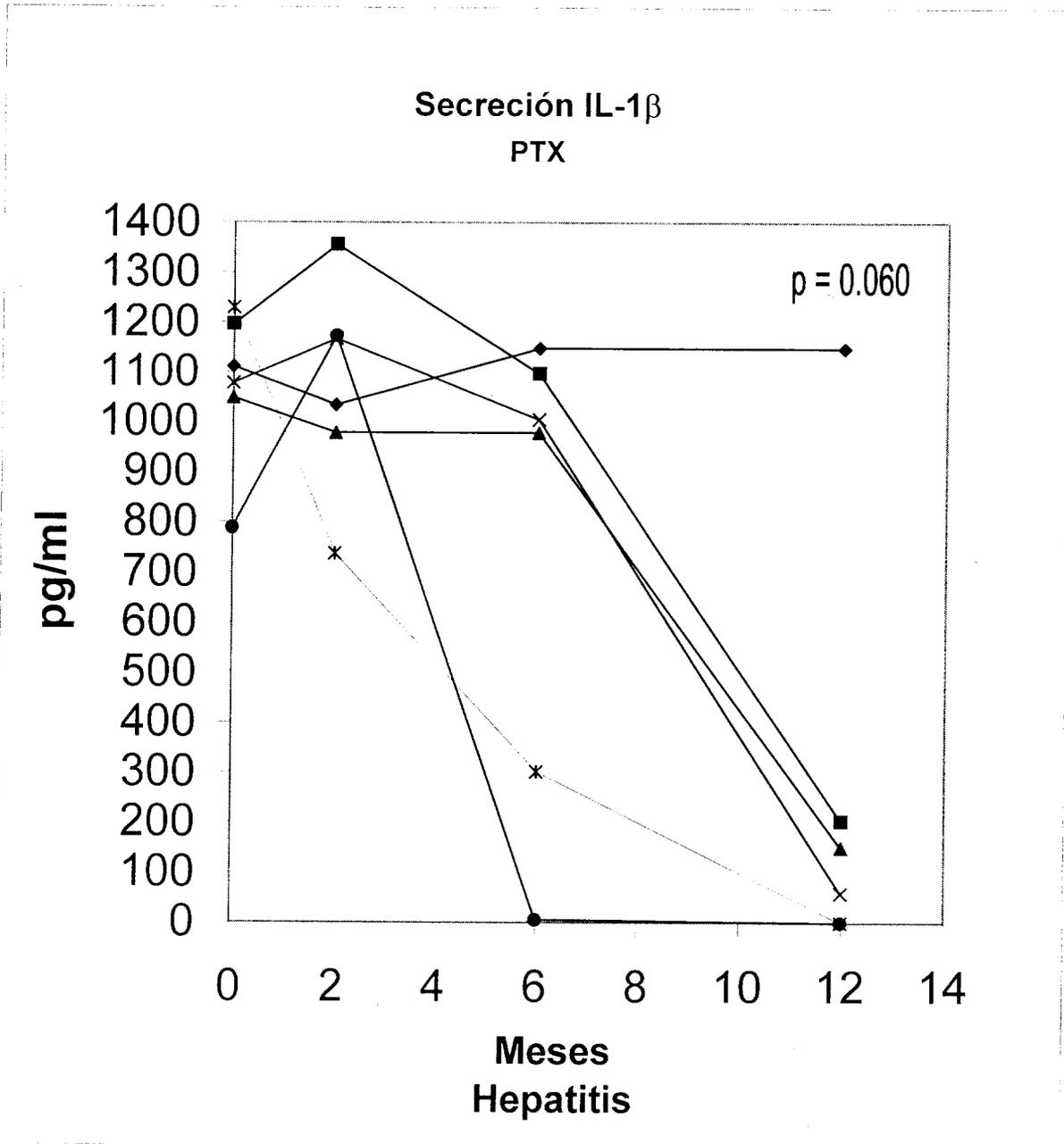
El decremento en los valores de secreción de IL-1 $\beta$  de los pacientes cirróticos tratados con colchicina se apreció al cabo de los 12 meses del tratamiento (Gráfica 10).



Gráfica 10.- Distribución de los valores de secreción de IL-1 $\beta$  de los pacientes que presentaron cirrosis y que fueron tratados con colchicina.

\*\*\*\*\*

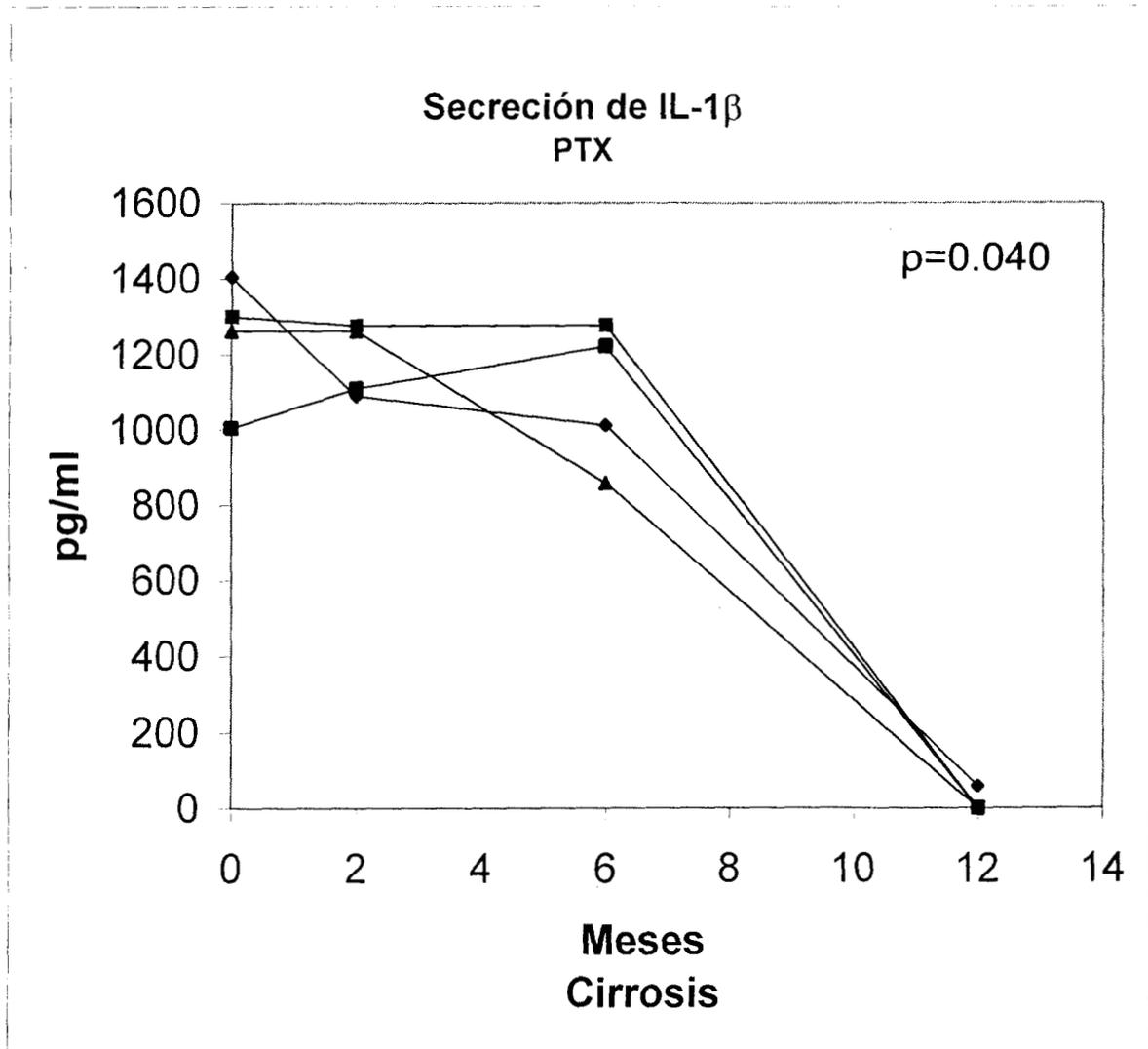
El decremento en los valores de secreción de IL-1 $\beta$  fue consistente en 5 de los 6 pacientes tratados con PTX y que presentaron hepatitis llegando a disminuir al cabo de 12 meses de tratamiento (Gráfica 11).



Gráfica 11.- Distribución de los valores de secreción de IL-1 $\beta$  de los pacientes que presentaron hepatitis y que fueron tratados con PTX.

\*\*\*\*\*

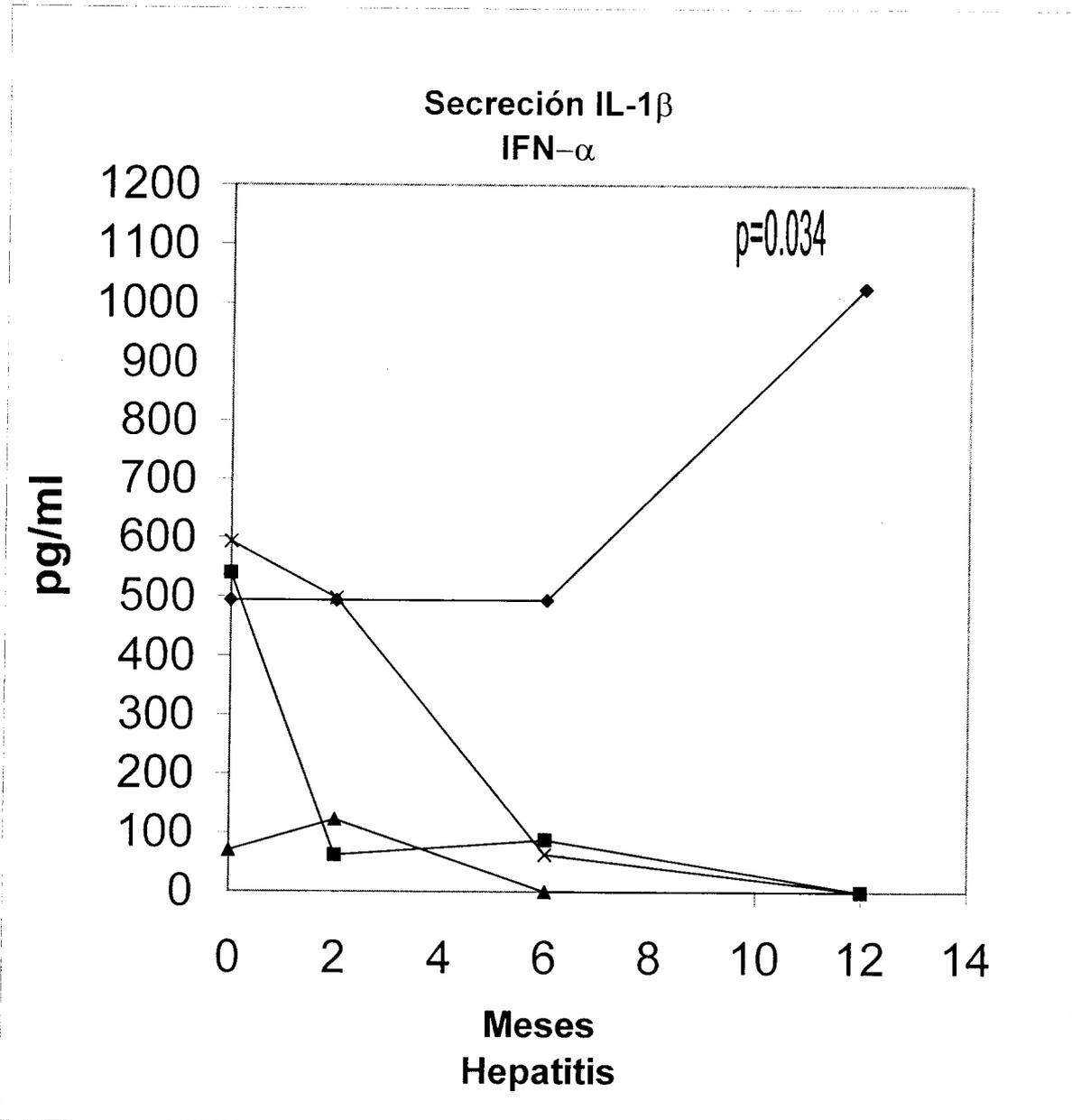
EL decremento en los valores de secreción de IL-1 $\beta$  fue consistente en todos y cada uno de los pacientes que presentaron cirrosis y que fueron tratados con PTX a partir del 6<sup>to</sup> mes del tratamiento (Gráfica 12).



Gráfica 12.- Distribución de los valores de secreción de IL-1 $\beta$  de los pacientes que presentaron cirrosis y que fueron tratados con PTX.

\*\*\*\*\*

El decremento en los valores de secreción de IL-1 $\beta$  fue consistente en 3 de los 4 pacientes con hepatitis, llegando a disminuir de forma constante a partir de los 6 meses (Gráfica 13).



Gráfica 13.- Distribución de los valores de secreción de IL-1 $\beta$  de los pacientes que presentaron hepatitis y que fueron tratados con IFN- $\alpha$ .

En la tabla 5 se muestra la correlación entre los valores de la expresión y secreción de la IL-1  $\beta$  con los valores de las transaminasas (ALT y AST). Como se puede observar, no hay una correlación entre los valores.

**Tabla 5**  
**Correlación de la expresión y secreción de IL-1 $\beta$  con los valores de ALT y AST**

Grupo	N	Exp - Sec	Exp - ALT	Exp - AST	Sec - ALT	Sec - AST
<b>Colchicina</b>						
Hepatitis	5	-0.31 (-0.95 a 0.95)	-0.11 (-0.63 a 0.63)	-0.27 (-0.63 a 0.63)	0.63 (-2 a 0.8)	0.8 (-0.2 a 0.95)
Cirrosis	3	0.92 (-0.78 a 1)	-0.82 (-0.95 a 0.82)	-0.82 (-1 a -0.28)	0.94 (-0.82 a 1)	0.33 (-0.82 a 0.78)
<b>Pentoxifilina</b>						
Hepatitis	6	0.37 (-1 a 1)	-0.48 (-1 a 0.95)	0.33 (-0.95 a 1)	0.62 (-0.33 a 1)	0.5 (-0.33 a 1)
Cirrosis	4	0.64 (-0.78 a 1)	0.07 (-0.33 a 0.26)	-0.03 (-0.77 a 0.95)	0.4 (0 a 0.63)	0.32 (0 a 1)
<b>Interferón-<math>\alpha</math></b>						
Hepatitis	4	0.52 (-0.78 a 0.95)	0.53 (-1 a 0.95)	0.24 (-1 a 1)	0.2 (-0.8 a 0.95)	0.4 (-0.4 a 0.95)
Cirrosis	3	0.33 (0.11 a 0.5)	-0.31 (-0.32 a -0.11)	-0.32 (-0.74 a -0.11)	0.63 (-0.21 a 0.78)	0.32 (-0.21 a 0.78)

• Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)

\*\*\*\*\*

5.4.- EXPRESION y SECRECION de TNF- $\alpha$ 

En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos de la expresión del TNF- $\alpha$  de los pacientes a los diferentes tiempos de seguimiento. Se observa que no hay cambios significativos en los valores.

Las correlaciones a los dos meses entre los valores de la carga viral y los valores de la expresión y secreción de esta citocina variaron de entre 0.329 a 0.510 y ninguna fue estadísticamente significativa.

Tabla 6

Distribución de los valores de expresión de TNF- $\alpha$  ( pg / ml ) por tratamiento, tipo de lesión y tiempo de seguimiento.

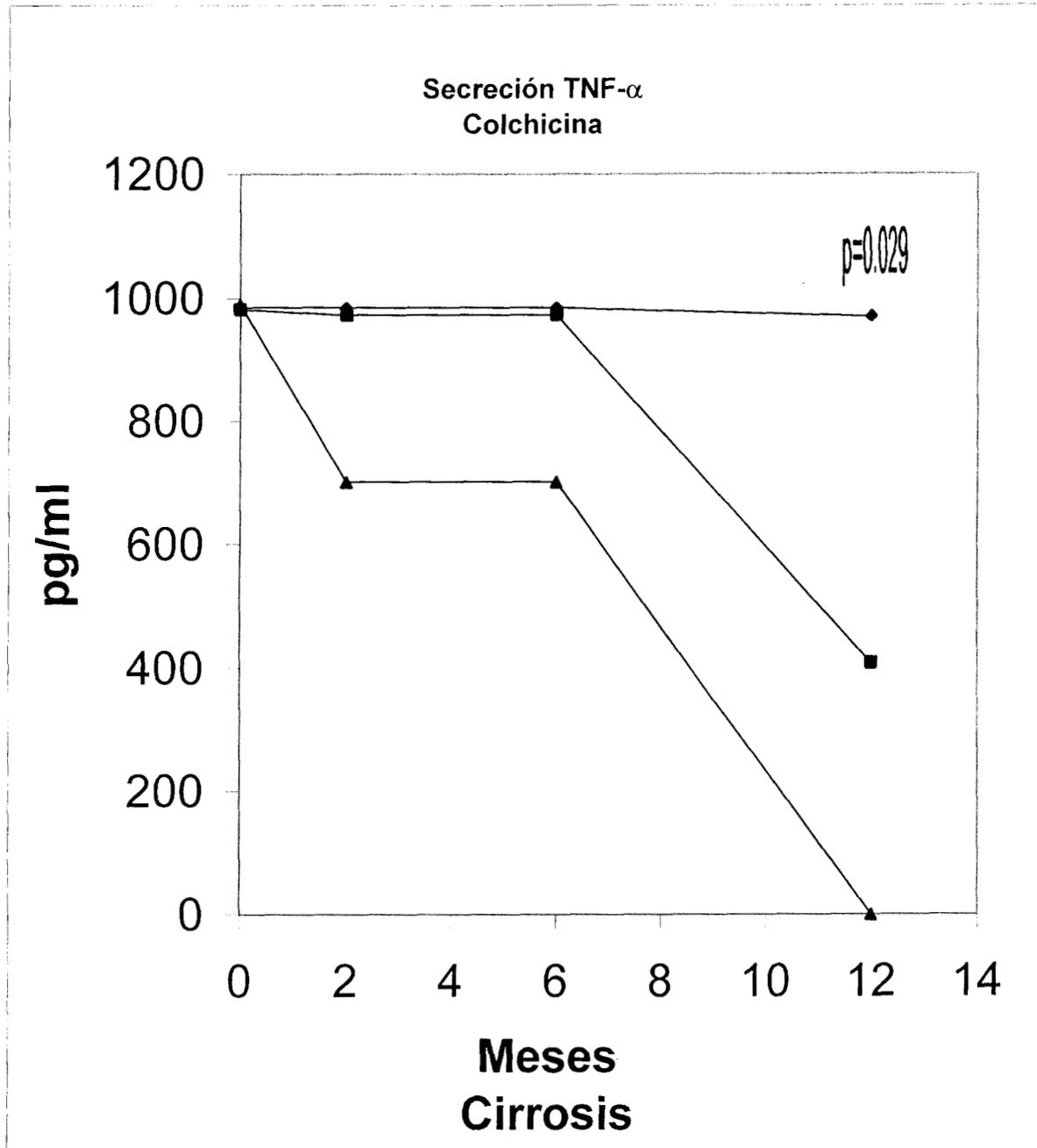
GRUPO	n	0 Meses	2 Meses	6 Meses	12 Meses
Colchicina					
Hepatitis	5	2.5 (0.65 – 1650)	750 (0.36 – 1650)	187.5 (0.36 – 970)	1.46 (0.36 – 23.43)
Cirrosis	3	23.43 (2.50 – 187.5)	0.36 (0.36 – 23.43)	0.36 (0.36 – 23.43)	0.95 (0.36 – 4.5)
Pentoxifilina					
Hepatitis	6	24.76 (1.46 – 1500)	24.68 (0.36 – 1480)	2.36 (0.36 – 2000)	1.91 (0.36 – 375)
Cirrosis	4	5.85 (1.46 – 1700)	185.6 (0.73 – 1700)	1.82 (0.36 – 185.6)	2.6 (0.36 – 4.25)
Interferón- $\alpha$					
Hepatitis	4	0.36 (0.36 – 0.36)	0.36 (0.36 – 4.82)	2.5 (0.36 – 4.5)	0.36 (0.36 – 1.46)
Cirrosis	3	1.46 (0.36 – 4.2)	1.58 (0.36 – 4.2)	4.2 (2.50 – 4.5)	4.5 (2.50 – 11.71)

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



\*\*\*\*\*

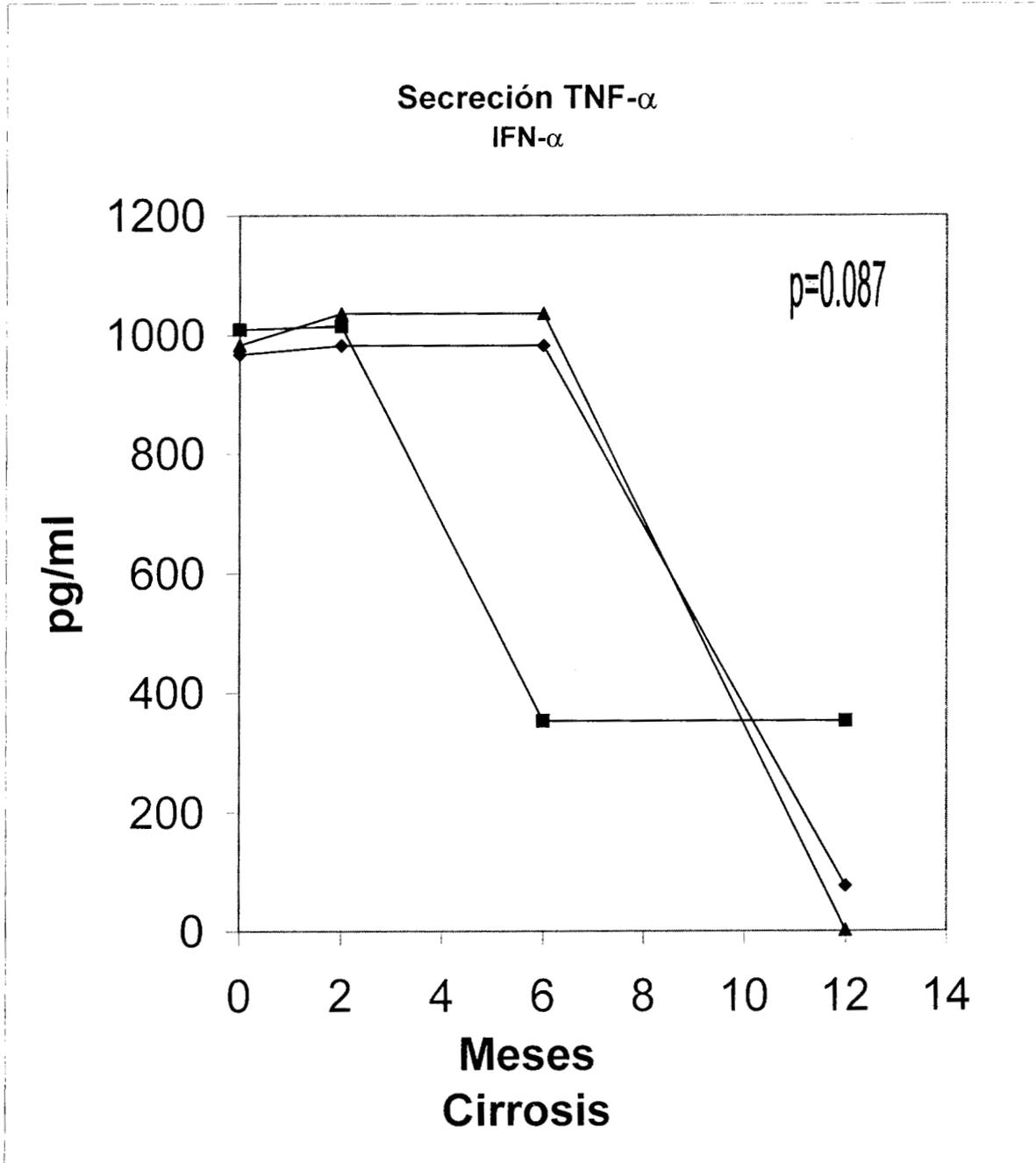
El decremento en los valores de la secreción de TNF- $\alpha$ , solo se observa en 2 de los 3 pacientes tratados con colchicina y que presentaron cirrosis hacia el final del tratamiento (Gráfica 14).



Gráfica 14.- Distribución de los valores de secreción de TNF- $\alpha$  de los pacientes que presentaron cirrosis y que fueron tratados con colchicina.

\*\*\*\*\*

Los valores de la secreción de TNF- $\alpha$ , en pacientes cirróticos tratados con IFN- $\alpha$ , permaneció incrementada en 2 de los 3 pacientes hasta el 6<sup>to</sup> mes y al terminar el tratamiento ésta disminuyó (Gráfica 15).



Gráfica 15.- Distribución de los valores de secreción de TNF- $\alpha$  de los pacientes que presentaron cirrosis y que fueron tratados con IFN- $\alpha$ .

En la tabla 8 se muestra la correlación entre la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  y los valores de ALT y AST. Se observa que los pacientes con hepatitis tratados con pentoxifilina presentan una correlación entre la expresión y la secreción de esta citocina. Lo que nos indica que la disminución de la expresión de esta citocina, también disminuye su secreción.

**Tabla 8**  
**Correlación de la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  con los valores de ALT y AST**

Grupo	n	Exp - Sec	Exp - ALT	Exp - AST	Sec - ALT	Sec - AST
<b>Colchicina</b>						
Hepatitis	5	0 (-0.89 a 0.4)	0 (-0.33 a 0.8)	0 (-0.82 a 0.8)	0.32 (-0.32 a 0.8)	0.32 (-0.26 a 0.95)
Cirrosis	3	0.82 (-0.033 a 0.82)	-0.82 (-0.95 a 0.82)	-0.78 (-0.82 a -0.27)	0 (-0.33 a 1)	-0.33 (-0.33 a 0.33)
<b>Pentoxifilina</b>						
Hepatitis	6	0.82 (0.4 a 1)*	0.30 (-0.82 a 1)	-0.56 (-0.82 a 1)	0.26 (-0.33 a 1)	-0.07 (-0.4 a 1)
Cirrosis	4	0.44 (-0.26 a 0.95)	0.30 (-0.4 a 0.32)	0.25 (-0.33 a 1)	0.63 (0.4 a 0.8)	0.8 (0.11 a 1)
<b>Interferón-<math>\alpha</math></b>						
Hepatitis	4	0.13 (-0.74 a 0.32)	0.11 (-0.26 a 0.32)	0.11 (-0.77 a 0.63)	0.45 (-0.4 a 0.8)	0 (-0.74 a 0.4)
Cirrosis	3	-0.24 (-0.74 a 0.82)	-0.74 (-0.89 a 0.26)	-0.74 (-0.89 a -0.26)	-0.21 (-0.21 a 1)	-0.21 (-0.74 a 1)

- Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)
- \* p = 0.031

\*\*\*\*\*

## 5.5.- EXPRESION y SECRECION de IL-8

En la tabla 9 se muestra la expresión de IL-8 de los pacientes a los diferentes tiempos de seguimiento. Se observa que solo hay cambio significativo en los pacientes con cirrosis tratados con PTX.

Las correlaciones a los dos meses entre los valores de carga viral y los valores de la expresión y secreción de esta citocina variaron de entre 0.553 a 0.614 y ninguna fue estadísticamente significativa.

Tabla 9

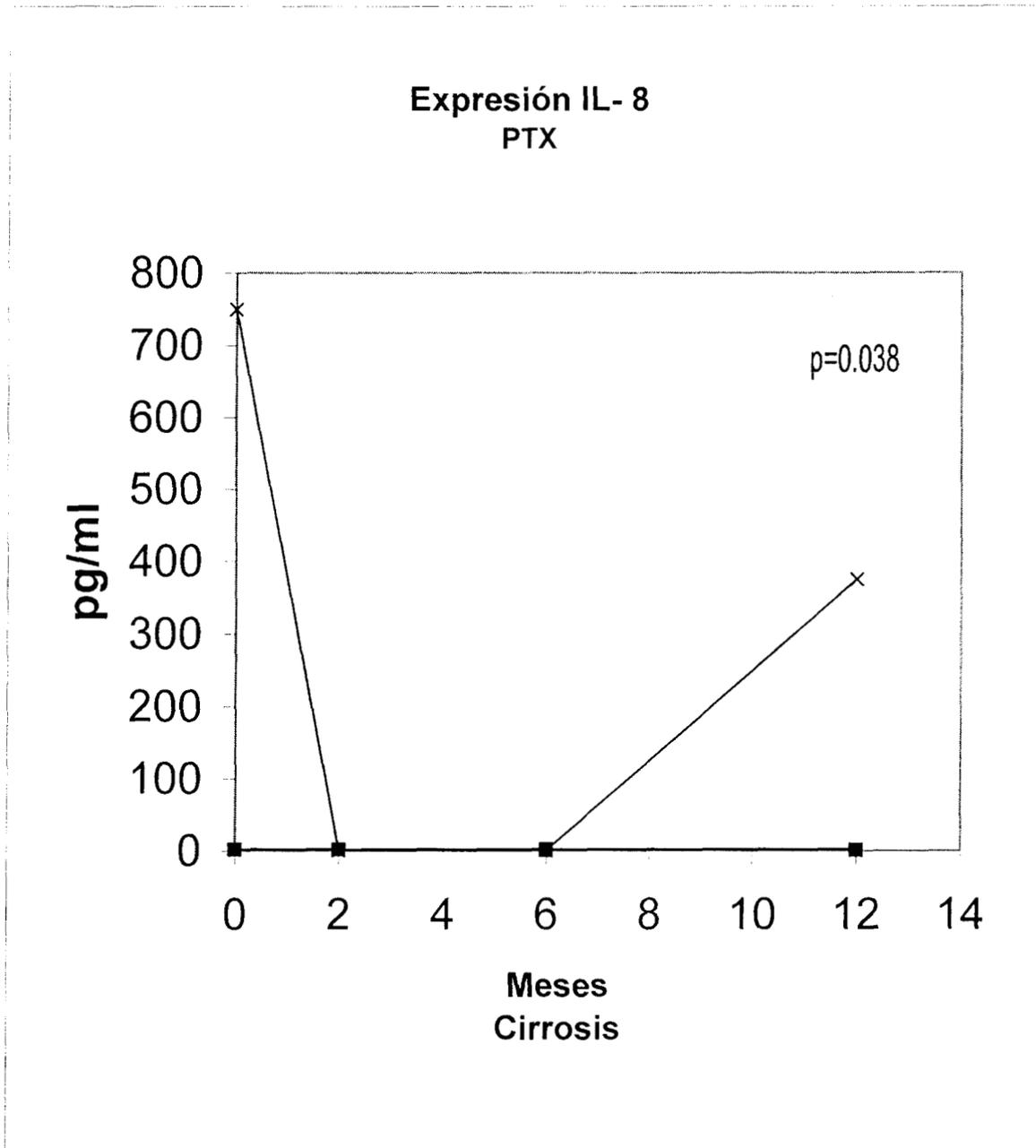
Distribución de los valores de la expresión de IL-8 ( pg / ml ) por tratamiento, tipo de lesión y tiempo de seguimiento.

GRUPO	n	0 Meses	2 Meses	6 Meses	12 Meses
Colchicina					
Hepatitis	5	2.5 (0.50 – 5.85)	5.85 (0.60 – 187.5)	0.73 (0.36 – 23.43)	4.2 (1.46 – 375)
Cirrosis	3	4.82 (0.70 – 375)	2.5 (2.50 – 4.82)	2.5 (2.50 – 4.82)	4.82 (1.46 – 5.20)
Pentoxifilina					
Hepatitis	6	0.40 (0.36 – 4.82)	2.5 (0.36 – 2.92)	2.5 (0.41 – 11.71)	3.96 (0.36 – 93.75)
Cirrosis *	4	2.6 (2 – 750)	2.5 (0.73 – 2.60)	2 (0.73 – 2.50)	1.8 (0.80 – 375)
Interferón- $\alpha$					
Hepatitis	4	3.59 (0.73 – 11.71)	7.31 (1.46 – 187.5)	22.61 (11.71 – 750)	3.67 (0.73 – 46.87)
Cirrosis	3	2.5 (1.50 – 4.82)	2.5 (0.36 – 2.70)	0.41 (0.36 – 4.82)	0.73 (0.41 – 4.20)

- Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)
- \* p = 0.038

\*\*\*\*\*

El decremento en los valores de la expresión de IL-8 fue consistente en todos y cada uno de los pacientes cirróticos tratados con PTX, llegando a ser estable desde los 2 meses. Solo uno de los pacientes presentó un incremento al final del tratamiento (Gráfica 16).



**Gráfica 16.-** Distribución de los valores de expresión de IL-8 de los pacientes que presentaron cirrosis y que fueron tratados con PTX.

\*\*\*\*\*

En la tabla 10 se muestran los valores obtenidos de la secreción de IL-8 en los pacientes a los diferentes tiempos de seguimiento. Hay cambios significativos en los pacientes con hepatitis tratados con colchicina al igual que los pacientes cirróticos tratados con pentoxifilina.

Tabla 10

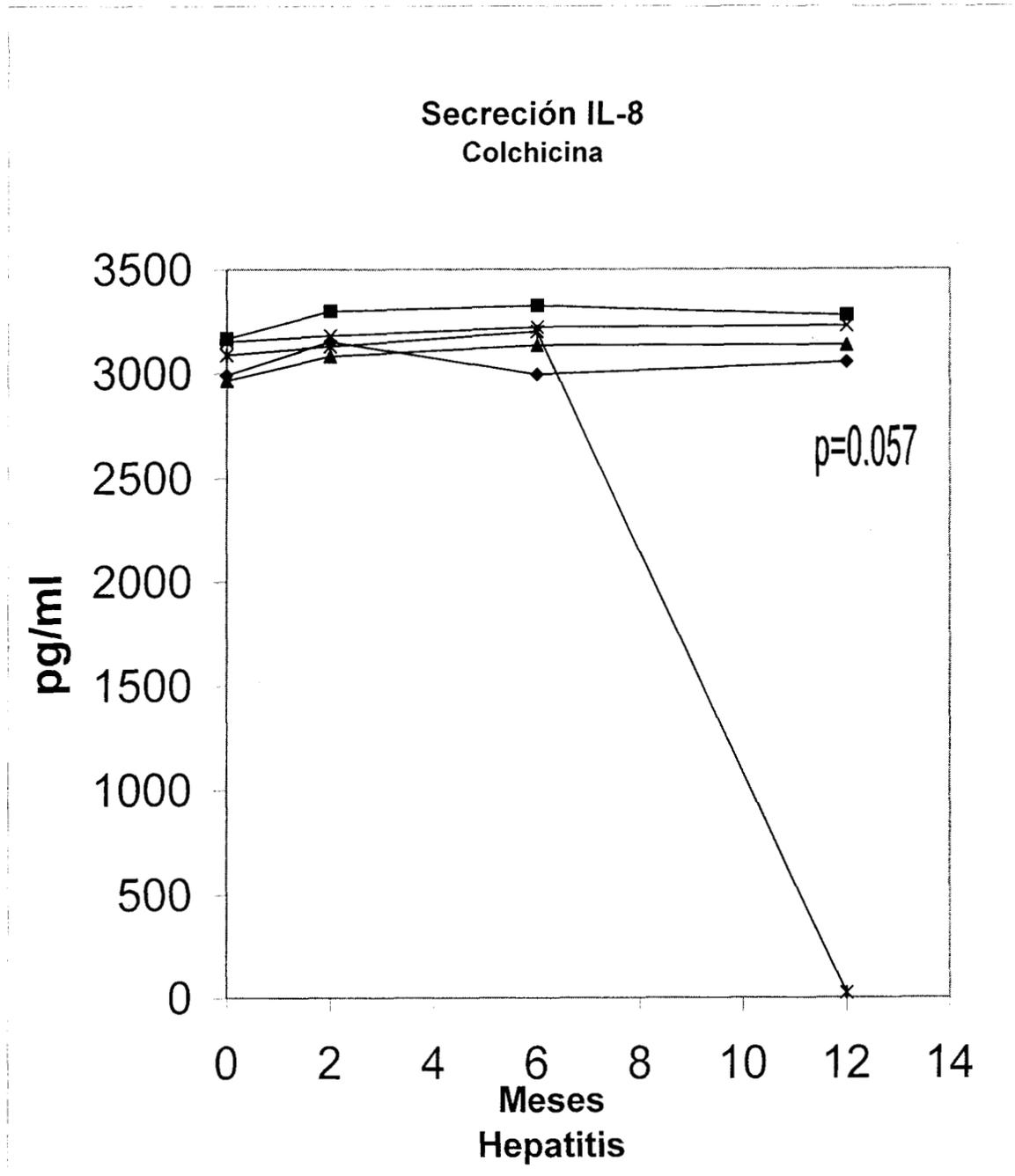
Distribución de los valores de secreción de IL-8 ( pg / ml ) por tratamiento, tipo de lesión y tiempo de seguimiento.

GRUPO	n	0 Meses	2 Meses	6 Meses	12 Meses
Colchicina					
Hepatitis*	5	3089 (2966 – 3166)	3153 (3084 – 3299)	3201 (2995 – 3325)	3134 (23 – 3276)
Cirrosis	3	3191 (3173 – 3281)	3265 (3140 – 3318)	3265 (3140 – 3318)	3104 (0 – 3351)
Pentoxifilina					
Hepatitis	6	3297 (3216 – 3369)	3153 (3052 – 3369)	3153 (0 – 3369)	3105 (0 – 3411)
Cirrosis**	4	3233 (3116 – 3337)	3281 (3187 – 3359)	3281 (3187 – 3359)	1538.5 (0 – 3244)
Interferón-α					
Hepatitis	4	3115 (2607 – 3277)	3093 (2607 – 3311)	3013 (916 – 3128)	2025 (50 – 3168)
Cirrosis	3	3310 (3200 – 3342)	3253 (3164 – 3453)	3165 (3164 – 3263)	3165 (10 – 3379)

- Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)
- \* p = 0.057                      \*\* p = 0.055

\*\*\*\*\*

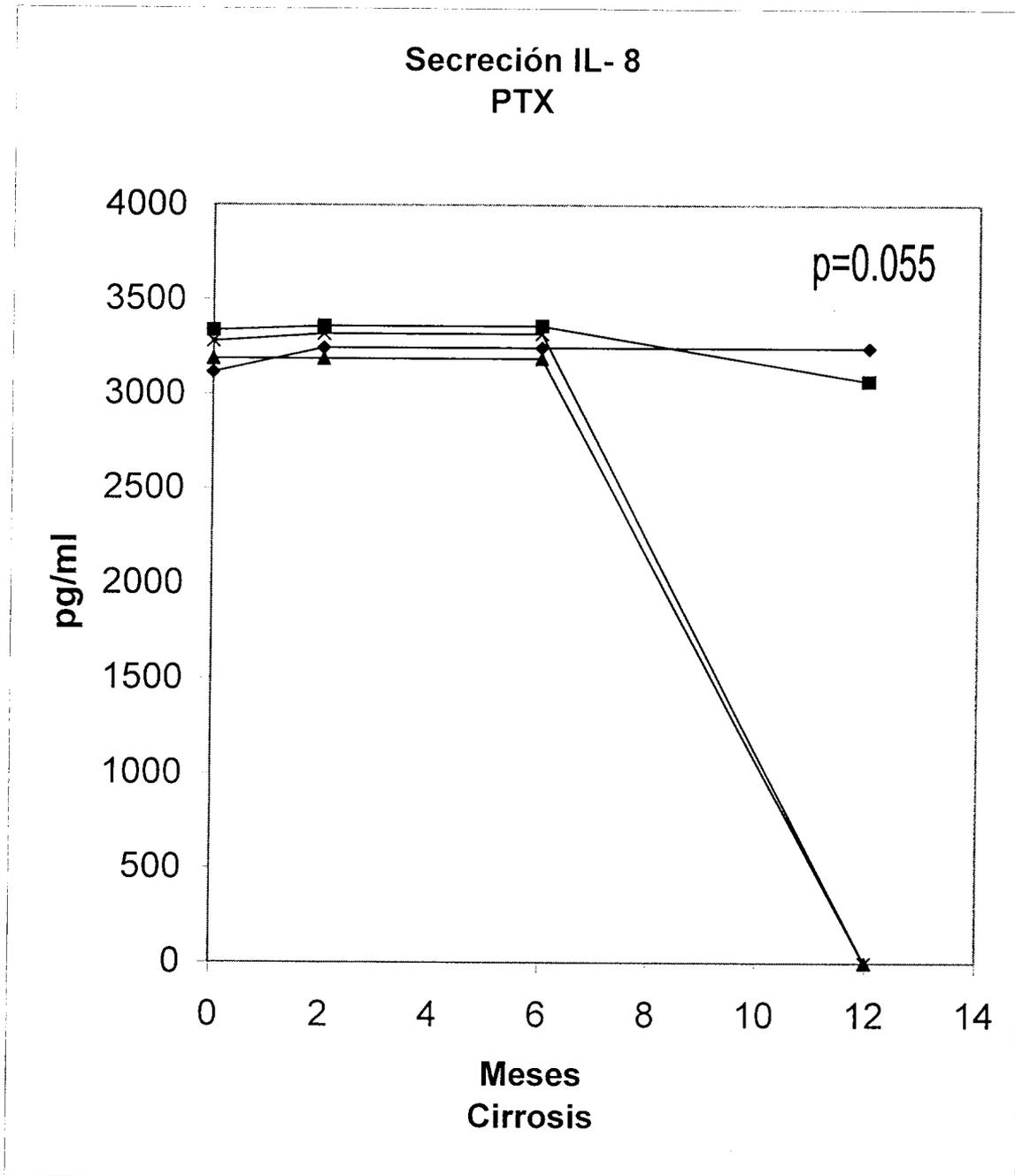
No se observa un decremento en los valores de la secreción de la IL-8 en los pacientes que presentaron hepatitis. Solo un paciente presentó un decremento al final del tratamiento (Gráfica 17).



Gráfica 17.- Distribución de los valores de secreción de IL-8 de los pacientes que presentaron hepatitis y que fueron tratados con colchicina.

\*\*\*\*\*

No se observa un decremento en los valores de la secreción de la IL-8 en los pacientes cirróticos tratados con PTX. Solo un paciente presentó un decremento al final del tratamiento (Gráfica 18).



Gráfica 18.- Distribución de los valores de secreción de IL-8 de los pacientes que presentaron cirrosis y que fueron tratados con PTX.

En la tabla 11 se muestra la correlación entre la expresión y secreción del IL-8 y los valores de ALT y AST. Se observa una correlación entre los valores de la expresión y los valores de las 2 aminotransferasas en los pacientes con hepatitis tratados con PTX.

**Tabla 11**  
**Correlación de la expresión y secreción de IL-8 con los valores de ALT y AST**

Grupo	N	Exp - Sec	Exp- ALT	Exp - AST	Sec - ALT	Sec - AST
<b>Colchicina</b>						
Hepatitis	5	0.4 (0 a 0.95)	-0.11 (-0.63 a 0.95)	-0.11 (-0.82 a 0.95)	0.64 (-0.8 a 0.8)	0.8 (-0.8 a 0.95)
Cirrosis	3	0.33 (-0.82 a 0.33)	0.82 (0.33 a 0.95)	0.82 (-0.78 a 1)	0 (-1 a 1)	0.33 (-1 a 0.33)
<b>Pentoxifilina</b>						
Hepatitis	6	0.26 (-0.63 a 1)	-0.52 (-0.95 a -0.33)*	-0.69 (-0.8 a -0.33)*	-0.33 (-0.74 a 0.95)	-0.26 (-0.77 a 1)
Cirrosis	4	0.39 (-0.82 a 0.82)	0.32 (0.26 a 0.78)	0.76 (0.26 a 0.95)	-0.21 (-0.77 a 0.64)	-0.21 (-0.77 a 0.11)
<b>Interferón-<math>\alpha</math></b>						
Hepatitis	4	-0.42 (-0.82 a 0.8)	-0.67 (-1 a -0.26)	-0.87 (-1 a 0.26)	0.15 (-0.8 a 0.95)	-0.17 (-0.8 a 0.95)
Cirrosis	3	0.5 (-0.5 a 0.78)	0.63 (-0.5 a 0.74)	0.74 (-0.5 a 0.95)	0.63 (0.21 a 1)	0.74 (0.64 a 1)

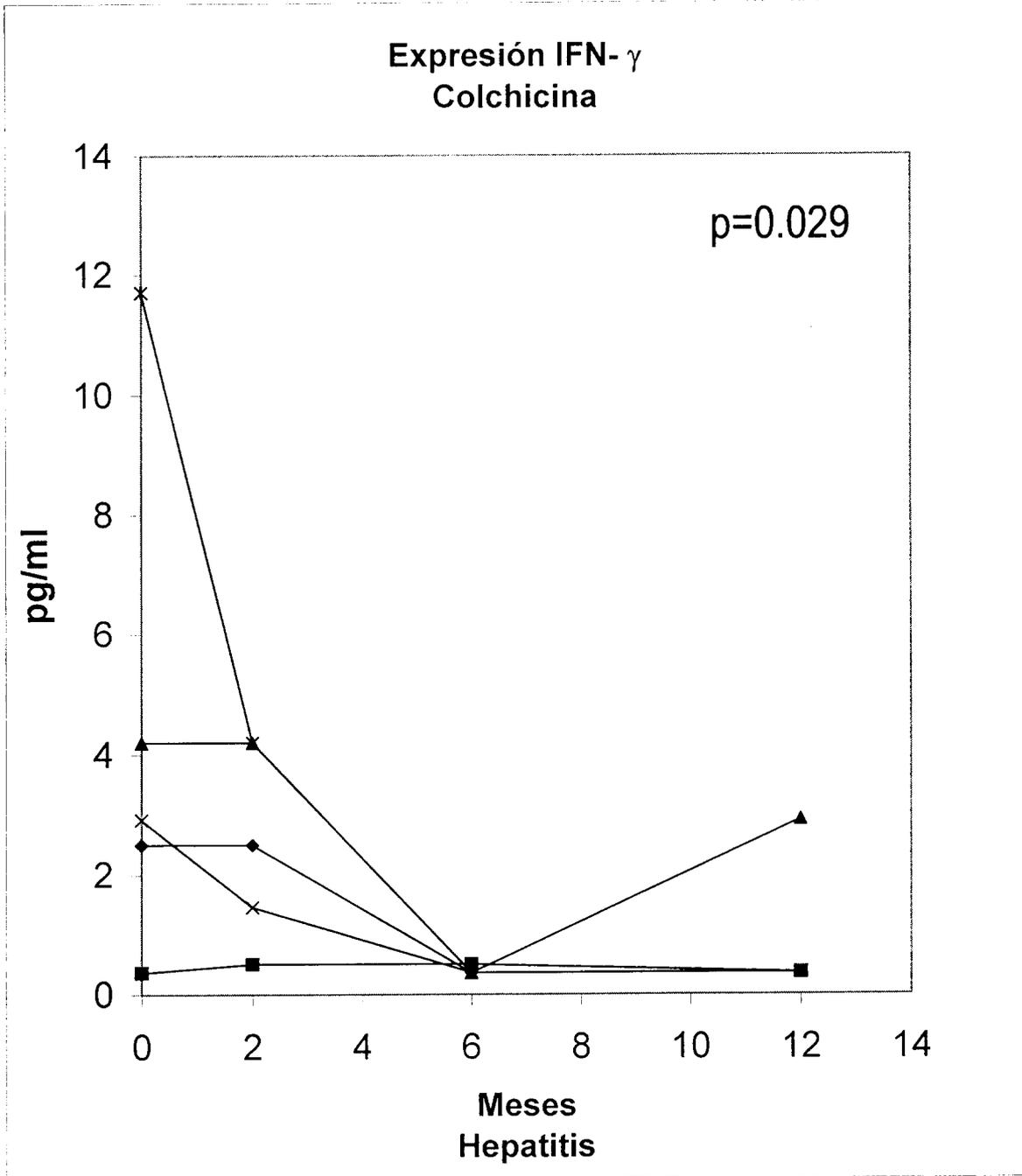
▪ Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)

▪ \* p = 0.031



\*\*\*\*\*

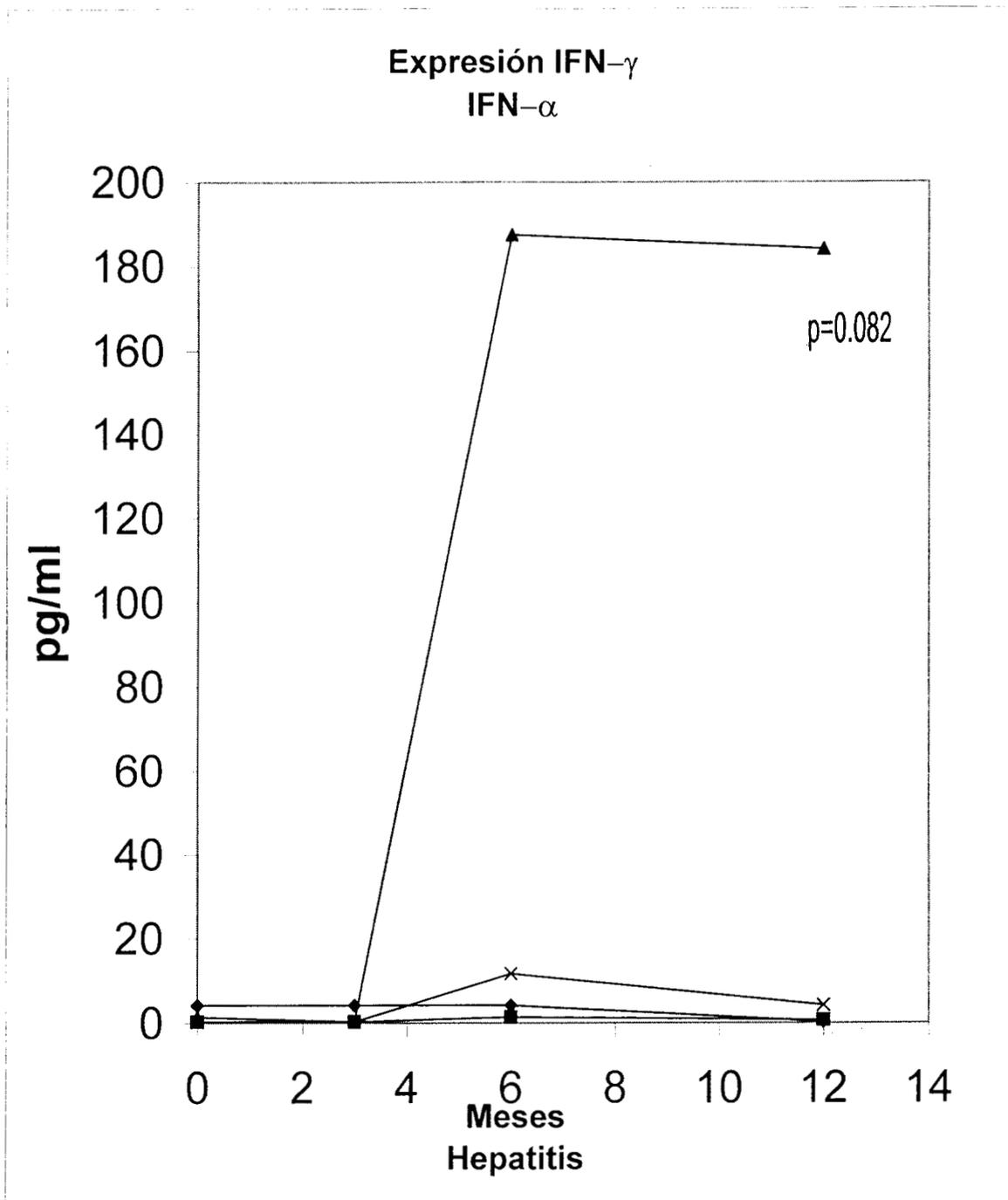
El decremento en los valores de expresión de IFN- $\gamma$  en pacientes con hepatitis tratados con colchicina, fue observado en el 6<sup>to</sup> mes del tratamiento (Gráfica19).



Gráfica 19.- Distribución de los valores de expresión de IFN- $\gamma$  de los pacientes que presentaron hepatitis y que fueron tratados con colchicina.

\*\*\*\*\*

Los valores de la expresión de IFN- $\gamma$  permanecieron constantes en 3 de 4 pacientes durante todo el tratamiento con IFN- $\alpha$  (Gráfica 20).



Gráfica 20.- Distribución de los valores de expresión de IFN- $\gamma$  de los pacientes que presentaron hepatitis y que fueron tratados con IFN- $\alpha$ .

\*\*\*\*\*

En la tabla 13 se muestra la secreción del IFN- $\gamma$  de los pacientes a los diferentes tiempos de seguimiento. Se observa que los pacientes tratados con colchicina presentan cambios significativos, al igual que los pacientes con cirrosis y que fueron tratados con IFN- $\alpha$ .

Tabla 13

Distribución de los valores de secreción de IFN- $\gamma$  (pg / ml) por tratamiento, tipo de lesión y tiempo de seguimiento.

GRUPO	n	0 Meses	2 Meses	6 Meses	12 Meses
Colchicina					
Hepatitis*	5	168 (32 – 405)	26 (8 – 263)	23 (1 – 57)	23 (0 – 58)
Cirrosis**	3	29 (4 – 341)	207 (2 – 224)	207 (2 – 224)	0 (0 – 1)
Pentoxifilina					
Hepatitis	6	33 (0 – 147)	29 (4 – 1727)	29 (0 – 1727)	2 (0 – 5)
Cirrosis	4	92 (17 – 160)	96 (5 – 791)	96 (5 – 791)	2 (0 – 32)
Interferón- $\alpha$					
Hepatitis	4	39.5 (0 – 290)	2.5 (0 – 26)	5.5 (2 – 10)	5 (0 – 72)
Cirrosis***	3	511 (2 – 738)	30 (0 – 56)	2 (0 – 30)	0 (0 – 6)

• Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)

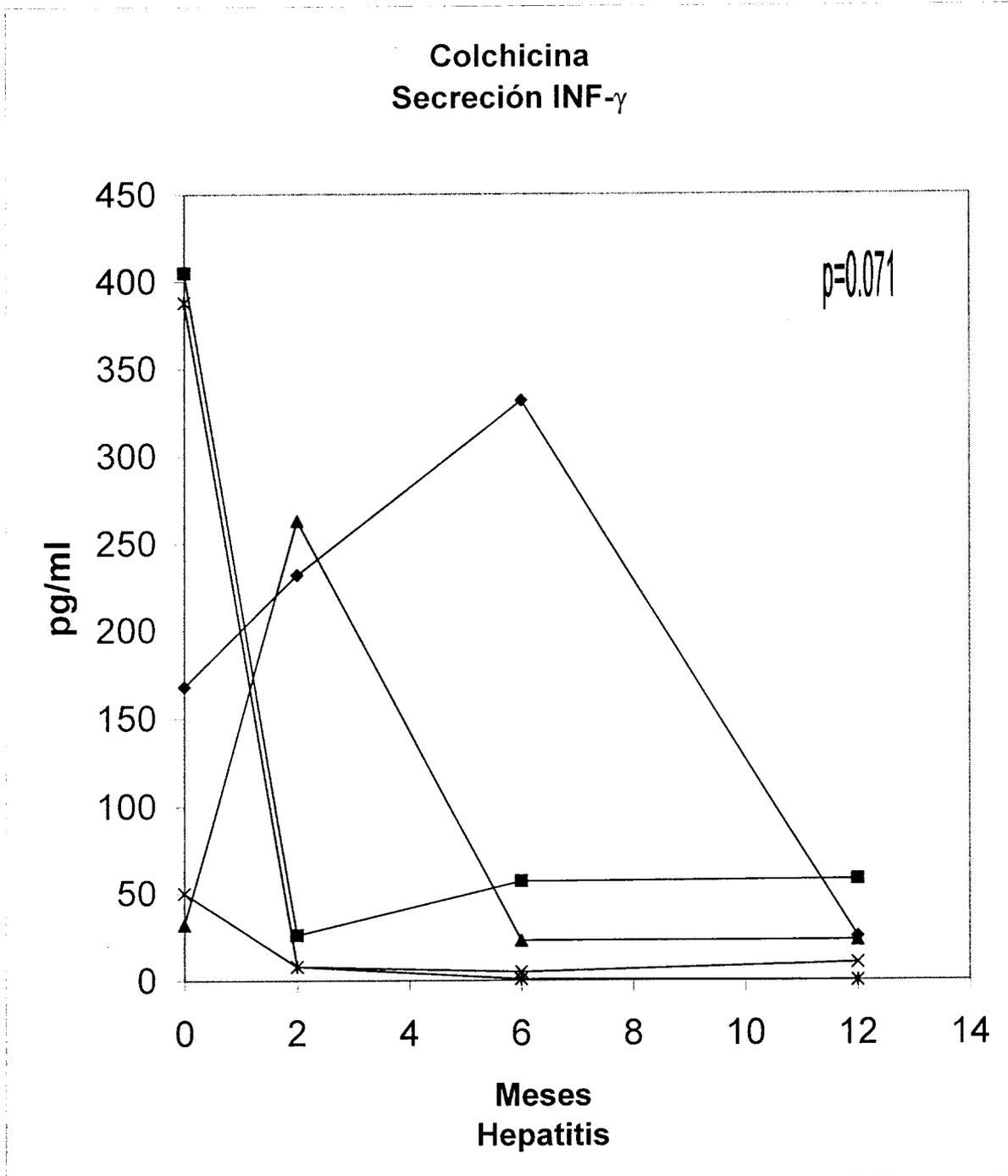
• \* p = 0.071

\*\* p = 0.096

\*\*\* p = 0.062

\*\*\*\*\*

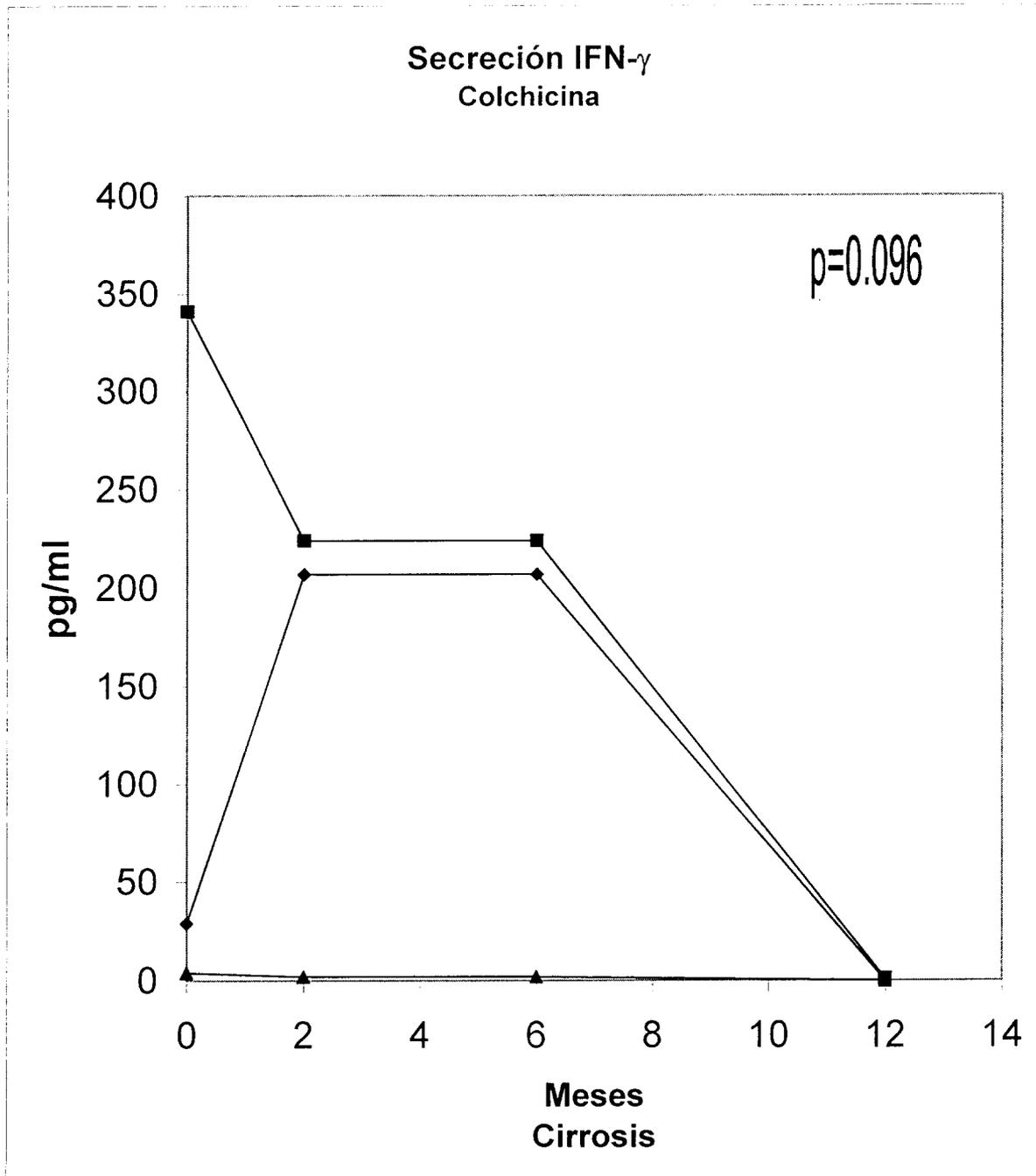
El decremento en los valores de la secreción de IFN- $\gamma$  en los pacientes se estabilizó en el 6<sup>to</sup> mes del tratamiento en 4 de los 5 pacientes con hepatitis y que recibieron colchicina (Gráfica 21).



Gráfica 21.- Distribución de los valores de secreción de IFN- $\gamma$  de los pacientes que presentaron hepatitis y que fueron tratados con colchicina.

\*\*\*\*\*

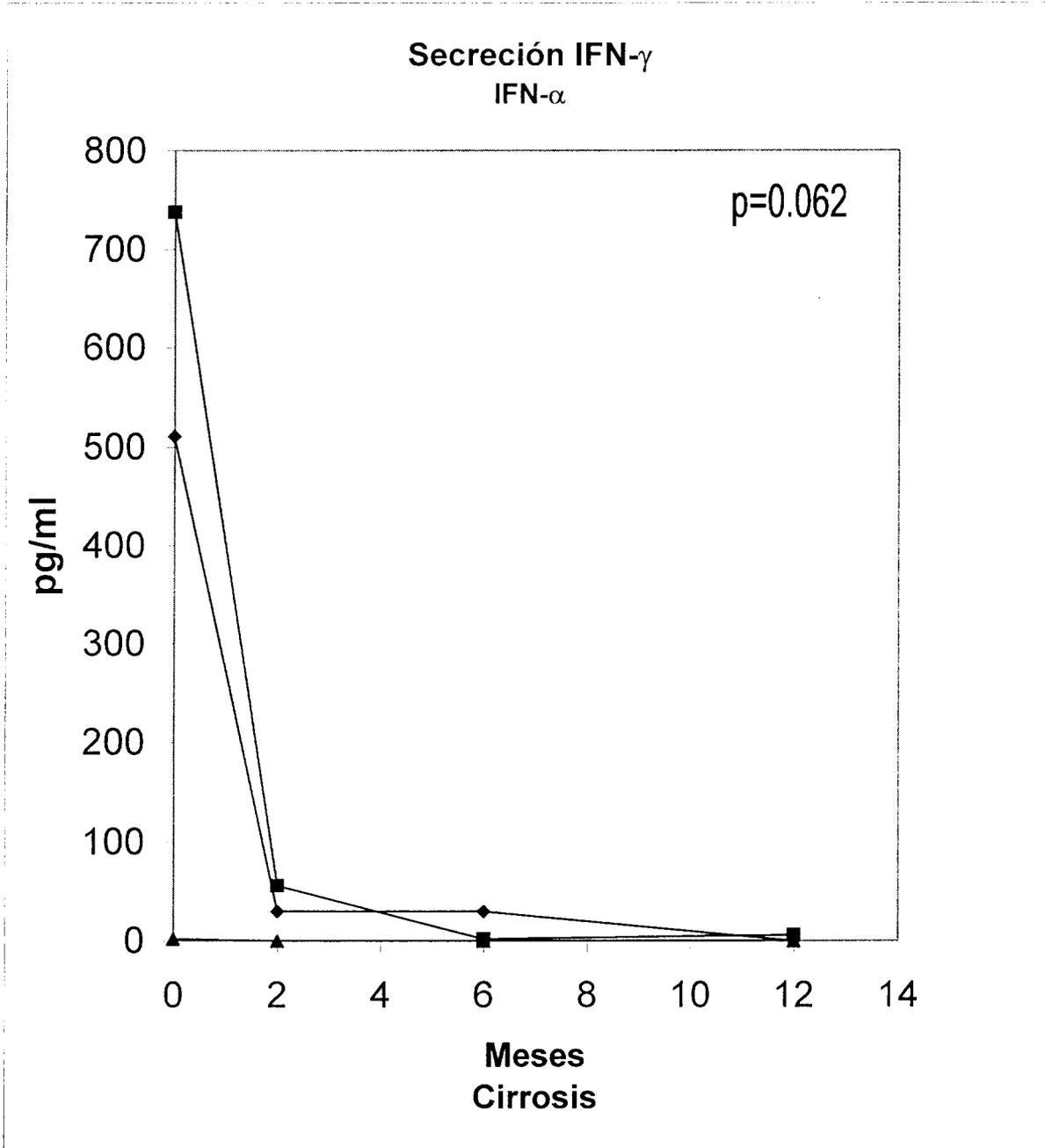
El decremento de los valores de la secreción de IFN- $\gamma$  se observó a partir del 6<sup>to</sup> mes del tratamiento en los pacientes cirróticos que recibieron colchicina (Gráfica 22).



Gráfica 22.- Distribución de los valores de secreción de IFN- $\gamma$  de los pacientes que presentaron cirrosis y que fueron tratados con colchicina.

\*\*\*\*\*

El decremento de los valores de la secreción de IFN- $\gamma$  fue consistente en todos y cada uno de los pacientes cirróticos tratados con IFN- $\alpha$ , llegando a ser constante a partir del 2<sup>do</sup> mes del tratamiento (Gráfica 23).



Gráfica 23.- Distribución de los valores de secreción de IFN- $\gamma$  de los pacientes que presentaron cirrosis y que fueron tratados con IFN- $\alpha$ .

En la tabla 14 se muestra la correlación entre la expresión y secreción del IFN- $\gamma$  y los valores de las transaminasas ALT y AST. Se observa una correlación entre los valores de la secreción y los valores de AST en los pacientes con hepatitis tratados con PTX y que presentan hepatitis.

**Tabla 14**  
Correlación de la expresión y secreción de IFN- $\gamma$  con los valores de ALT y AST

Grupo	n	Exp - Sec	Exp - ALT	Exp - AST	Sec - ALT	Sec - AST
<b>Colchicina</b>						
Hepatitis	5	0.89 (-0.89 a -0.95)	0 (-0.63 a 0.95)	0 (-0.95 a 0.95)	0.4 (-0.21 a 0.8)	0.4 (-0.74 a 0.8)
Cirrosis	3	0.82 (-0.33 a 0.82)	-0.58 (-0.81 a 0.33)	-0.82 (-0.82 a -0.78)	0 (-1 a 1)	-0.33 (-1 a 0.33)
<b>Pentoxifilina</b>						
Hepatitis	6	-0.27 (-0.32 a 0.26)	-0.1 (-0.95 a 0.4)	-0.4 (-0.95 a 0.4)	0.33 (-1 a 0.77)	0.32 (-0.26 a 0.78)*
Cirrosis	4	-0.16 (-0.33 a 0.82)	-0.30 (-0.8 a 0.25)	0.52 (-0.33 a 0.8)	-0.21 (-0.78 a 0.64)	-0.21 (-0.78 a 0.33)
<b>Interferón-<math>\alpha</math></b>						
Hepatitis	4	-0.78 (-0.83 a 0.21)	-0.50 (-1 a 0.21)	-0.30 (-0.95 a 0.26)	0.21 (-0.21 a 1)	0.21 (-0.74 a 0.8)
Cirrosis	3	0 (-0.8 a 0.33)	-0.21 (-0.21 a 0)	-0.21 (-0.74 a 0)	0.74 (0.63 a 0.77)	0.74 (0.32 a 0.78)

• Los valores se expresan como medianas (mínimo – máximo)

• \* p = 0.031

\*\*\*\*\*

## 6.- DISCUSION

En este estudio se investigó el efecto de la colchicina, pentoxifilina e interferón- $\alpha$  sobre la expresión y secreción de citocinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en linfocitos de pacientes que presentan hepatitis C o cirrosis por hepatitis C.

Los resultados obtenidos se analizaron en relación con cada fármaco y parámetro estudiado.

### 1.- COLCHICINA

#### 1.1.- ALT y AST

Primero se analizaron los niveles de ALT y AST de los pacientes, observándose que ambos grupos presentaron una disminución en los valores aunque ésta no fue significativa.

El que disminuyan estos valores nos puede indicar que el hígado se está recuperando de la lesión provocada por el virus y que este fármaco puede estar ayudando a que disminuya la inflamación, esto concuerda con lo establecido por Villalobos, JJ. (1988), quien comenta que al haber un daño en las células hay un incremento importante en los valores de las transaminasas, debido a que los mecanismos intracelulares de regulación se ven alterados.

#### 1.2.- CARGA VIRAL

Después se realizó la carga viral en el plasma de los pacientes para saber si ésta disminuía con el tratamiento administrado. El valor aceptado para que una carga viral sea negativa es  $< 0.2$  mEq/ml. En este trabajo se observó que 3 pacientes sufrieron el incremento de la carga viral y 4 presentaron una pequeña disminución. Esto indica que el virus sigue presente y sigue dando lugar a que la inflamación continúe. Quian, C y col. (1992) demostraron que el VHC puede infectar las PBMC y replicarse en estas células. Esto concuerda con los datos obtenidos en este trabajo, ya que se presenta un incremento en la carga viral.

\*\*\*\*\*

Cabe mencionar que los valores de la carga viral no correlacionan con la expresión y secreción de las citocinas estudiadas a los dos meses. Esto no es indicativo de que al año de seguimiento, cuando se observaron algunos cambios en la expresión de IFN- $\gamma$  y en la secreción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , de IL-8 y de IFN- $\gamma$ , éstos no estuvieran relacionados con cambios en los valores de la carga viral. A este respecto, no se ha encontrado reporte alguno en la literatura sobre la carga viral y alguna relación con la expresión y secreción de citocinas.

### 1.3.- EXPRESION y SECRECION de CITOCINAS en LINFOCITOS

#### *Pacientes con hepatitis*

En este trabajo se observó que la expresión y secreción de IL-1  $\beta$ , al término del tratamiento, permanecieron constantes y que la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  disminuyeron pero no de manera significativa. Esto concuerda con lo reportado por Entzian, P y col. en 1997, quienes muestran que la colchicina es un pobre inhibidor de citocinas fibrogénicas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

El que sigan presentes estas citocinas nos puede indicar que el proceso inflamatorio está presente todavía pero esta siendo controlado por la acción del fármaco, además, la carga viral se encuentra elevada, lo cual indica que el virus está presente y que este puede ayudar a que la lesión aumente.

En esta investigación se observó que tanto la expresión como la secreción de la IL-8 permanecen constantes y solo se encuentra incrementada en un paciente, el cual presentó tuberculosis. Esta citocina es producida en respuesta a un virus o a una bacteria (Mahalingam, S y col. 1994), por lo que al haber un incremento en la carga viral, esta citocina sigue estando presente, además de que el caso de tuberculosis también pudo alterar los datos obtenidos. El que el virus esté presente, también puede dar lugar a que esta citocina sea expresada y secretada como respuesta del sistema inmune para eliminarlo. No hay que olvidar que estas mediciones se realizaron en linfocitos y como se sabe, estos nos indican cómo se encuentran las citocinas a nivel sistémico, por lo que esta enfermedad nos puede incrementar los valores de esta citocina en este pacientes. Ahora bien, el que tanto la expresión como la secreción de la IL-8 permanezcan constantes nos puede indicar que la inflamación sigue presente y los neutrófilos son atraídos al sitio de la lesión.

\*\*\*\*\*

Con respecto a la expresión y secreción de IFN- $\gamma$  no se ha encontrado ningún reporte de este fármaco en una lesión hepática, por lo que solo se puede decir que tanto la expresión como la secreción de IFN- $\gamma$  se encuentra disminuida, esto nos puede indicar que la colchicina presenta acción antifibrogénica ya que al estar disminuido el IFN- $\gamma$  nos puede indicar que ya no se necesita de esta citocina pues su función está siendo realizada por el fármaco. También hay que recordar que esta citocina tiene acción proinflamatoria y el que se encuentre disminuida su expresión y secreción nos puede indicar que el fármaco esta contribuyendo a detener la inflamación.

*Pacientes con cirrosis*

En este grupo de pacientes, observamos que las citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) presentan una disminución, principalmente la secreción de TNF- $\alpha$ , ya que esta presenta una disminución significativa ( p = 0.029). El que haya una disminución en esta citocina puede indicar que el proceso inflamatorio está disminuyendo, esto concuerda con lo reportado por Hill, D y col. 1997.

Con respecto a la expresión como a la secreción de la IL-8, se encontró que permanecen constantes y solo uno de los pacientes presentó una disminución significativa tanto de la expresión como de la secreción, el que hayan disminuido los valores de esta citocina en este paciente, puede deberse a que presentaba una infección en los riñones cuando fue tomada la muestra de sangre (tiempo cero) y como tanto la expresión como la secreción fueron evaluadas en los linfocitos, esto puede dar lugar a una alteración en los resultados. Como ocurrió con el paciente que presentó tuberculosis en el grupo de hepatitis.

Se sabe que el IFN- $\gamma$  tiene propiedades antifibrogénicas, ya que inhibe la producción de colágena, por lo que al encontrar disminuida tanto la expresión como la secreción de esta citocina, se puede decir que su función es realizada por el fármaco, por lo que el organismo ya no requiere de su síntesis. No hay que olvidar también que tiene acción proinflamatoria y el que se encuentre disminuida su expresión al igual que su secreción nos puede indicar que la inflamación esta disminuyendo.

\*\*\*\*\*

## 2.- PENTOXIFILINA

### 2.1.- ALT y AST

Se analizaron los valores de las transaminasas de los pacientes de ambos grupos y se observó que tanto los valores de ALT como los de AST disminuyeron al final del tratamiento, pero esta disminución no fue significativa. El que los valores hayan disminuido, concuerda con lo reportado por Villalobos, JJ. (1988), quien explica que al haber un daño en las células hay un incremento importante en los valores de las transaminasas.

### 2.2.- CARGA VIRAL

En cuanto a la carga viral, se observó que 2 pacientes permanecieron con valores negativos (desde el inicio del tratamiento) y 5 presentaron una disminución, pero no llegaron a valores negativos ( $< 0.2\text{mEq/ml}$ ). Lo cual indica que el virus sigue estando presente en estos pacientes.

El que no se haya encontrado una correlación entre los valores de la carga viral y la expresión y secreción de las citocinas estudiadas a los dos meses, no es indicativo de que al año de seguimiento, donde se observaron algunos cambios en la expresión de IL-8 y en la secreción de IL-1 $\beta$  y de IL-8, éstos no estuvieran correlacionados con los cambios en los valores de la carga viral. A este respecto, no se ha encontrado algún reporte en la literatura sobre si existe una correlación entre la expresión y secreción de las citocinas y la carga viral.

### 2.3.- EXPRESION y SECRECION de CITOCINAS en LINFOCITOS

#### *Pacientes con hepatitis*

Los resultados obtenidos para la expresión de la IL-1 $\beta$  muestran que permanece constante hasta el final del tratamiento, mientras que la secreción disminuye significativamente. En cuanto al TNF- $\alpha$  se tiene que tanto la expresión como la secreción disminuyen pero no de forma significativa. El que no disminuyan como era de esperarse puede deberse a la acumulación del

\*\*\*\*\*

ARNm para el TNF- $\alpha$  que ocurre en las células infectadas (Larrea, E y col. 1992), lo cual puede resultar en el incremento de la expresión de esta citocina.

En cuanto a la IL-8 se observó que su expresión presentó un ligero incremento sin ser significativo y la secreción permaneció constante. El que no se presente un cambio en esta citocina, puede indicar que la lesión sigue presente y que los neutrófilos siguen siendo atraídos al sitio de la inflamación. Solo un paciente presentó un incremento significativo, esto puede deberse a que presentó un absceso amibiano lo cual puede provocar un incremento en los valores de esta citocina, pues como reportan Mahalingam, S y col. 1994, esta citocina es producida en respuesta a un virus o a una bacteria, lo que puede alterar los valores obtenidos, además, los valores tanto la expresión como la secreción fueron determinados en linfocitos y estos nos indican como se encuentra todo el organismo y no solo el hígado.

Con el IFN- $\gamma$  se obtuvo que la expresión sufre un incremento no significativo y la secreción una disminución también no significativa, por lo que se puede decir que el fármaco también desarrolla su efecto antifibrogénico ya que al disminuir la secreción de esta citocina nos puede indicar que ya no se está sintetizando por que el fármaco está realizando la función de esta citocina.

#### *Pacientes con cirrosis*

En este grupo de pacientes se observó que la expresión y la secreción de IL-1 $\beta$  disminuyeron siendo significativa esta última. Mientras que la expresión y secreción del TNF- $\alpha$  disminuye pero no de forma significativa. El TNF- $\alpha$  posiblemente no disminuyó porque los pacientes tenían diversas enfermedades, las cuales incrementan a las citocinas proinflamatorias. Los resultados obtenidos no concuerdan con lo reportado con Neuner, P y col. 1994, esto puede deberse a que como ya se dijo, los pacientes presentaron diversas enfermedades inflamatorias durante todo el tratamiento.

Neuner, P y col. (1994), reportan que la IL-8 muestra una disminución en su producción, esto también se observó en los resultados que se obtuvieron, ya que tanto la expresión como la secreción disminuyeron significativamente, lo cual nos indica que la señal de atracción para los neutrófilos es menor y por consiguiente disminuye su número en el sitio de la lesión.

\*\*\*\*\*

Rieneck, K y col. (1993) reportaron que la PTX disminuye la expresión de IFN- $\gamma$ . En este trabajo, se obtuvo que la expresión aumentó aunque no fue de forma significativa, esto no concuerda con lo reportado por los investigadores, pero puede deberse a que los resultados que se obtuvieron fueron con los linfocitos y como se sabe estos nos dan un reporte de cómo se encuentra todo el organismo, lo cual no puede dar resultados alterados. La secreción tuvo una disminución pero no fue significativa. Debido a que esta citocina tiene acción proinflamatoria, el que su secreción se encuentre disminuida nos puede indicar que la inflamación está disminuyendo.

En cuanto a los dos pacientes cirróticos que presentaron, desde el inicio del tratamiento, valores negativos en la carga viral, se puede decir que no presentaron ningún patrón de expresión y secreción de las citocinas diferente al de los pacientes que presentaron una carga viral alta al inicio del estudio.

\*\*\*\*\*

### 3. - INTERFERON - $\alpha$

#### 3.1.- ALT y AST

Al analizar los valores de las transaminasas en ambos grupo de pacientes, se observó que el grupo de pacientes que presentaban hepatitis, los valores sufren un ligero incremento, el cual no es significativo, este incremento puede deberse a que uno de los pacientes suspendió el tratamiento varias veces. Aunque hay reportes que indican que los niveles séricos de ALT pueden ser anormales durante la terapia en aproximadamente un 50% de los pacientes (Boyer, N y col. 2000). En cuanto al grupo de pacientes que presentaban cirrosis, los valores de ALT, aunque no llegaron a estar dentro del rango normal (12-63 U.I/ml), presentaron una disminución significativa ( $p < 0.047$ ). Esto se puede explicar debido a que cuando se presenta un daño, los mecanismos de defensa se alteran y se produce una alteración en las transaminasas (Villalobos, JJ. 1988), al presentarse una disminución en estos valores, nos puede indicar que el fármaco está actuando y se está llevando a cabo una recuperación del equilibrio de los mecanismos de defensa.

#### 3.2.- CARGA VIRAL

Los resultados obtenidos de la carga viral fueron: 3 pacientes presentaron disminución hasta llegar a valores negativos, 4 presentaron una disminución, pero no llegaron a valores negativos ( $<0.2\text{mEq/ml}$ ). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en la literatura. Por lo que se puede decir, que este fármaco tiene una buena acción sobre la replicación viral y que puede ayudar a eliminar el virus para sí mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Es importante mencionar que los valores de la carga viral no correlacionan con la expresión y secreción de las citocinas estudiadas a los dos meses, por lo que esto no es indicativo de que al año de seguimiento, cuando se observaron cambios en la expresión de IFN- $\gamma$  y en la secreción de IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  y de IFN- $\gamma$ , éstos no estuvieran relacionados con cambios en los valores de la carga viral. A este respecto, no se ha encontrado reporte alguno sobre si existe alguna correlación entre la carga viral y la expresión y secreción de citocinas.

\*\*\*\*\*

### 3.3.- EXPRESION y SECRECION de CITOCINAS en LINFOCITOS

#### *Pacientes con hepatitis*

Con respecto a las citocinas, en este trabajo se observó que hay una disminución en la expresión y secreción de IL-1 $\beta$  al finalizar el tratamiento, pero no fue significativa. En cuanto al TNF- $\alpha$ , la expresión permanece constante y su secreción disminuye pero no de manera significativa. El que no haya disminuido esta citocina puede deberse al ARNm almacenado en las células infectadas, como lo mencionan Quian, C y col. 1992.

En cuanto a la IL-8, se obtuvo que la expresión permanece constante hasta el final del tratamiento, mientras que la secreción disminuye pero no de forma significativa. Ahora bien, la presencia de leucocitos en el sitio de la infección es uno de los pasos más importantes en los procesos inflamatorios (Kunkel, SL y col. 1993); por lo que se puede pensar que todavía está presente una lesión y que los neutrófilos siguen llegando al sitio de la lesión.

Con el IFN- $\gamma$  se presenta una tendencia al incremento en la expresión mientras que la secreción disminuye pero no de forma significativa, esto nos puede indicar que la inflamación sigue presente.

#### *Pacientes con cirrosis*

En este grupo de pacientes se obtuvo que tanto la expresión como la secreción de la IL-1 $\beta$  presentaron una disminución pero no fue significativa. Mientras, la expresión del TNF- $\alpha$  presentó un ligero incremento sin ser significativo, mientras que la secreción presentó una tendencia a disminuir. El que disminuyan las citocinas proinflamatorias nos puede indicar que la inflamación está disminuyendo.

La IL-8 presentó una disminución no significativa en su expresión, mientras que su secreción permaneció constante hasta el final del tratamiento, lo cual nos puede indicar al igual que en grupo de pacientes con hepatitis, que los neutrófilos siguen llegando al sitio donde se encuentra la lesión.

Con respecto al IFN- $\gamma$  se observó que la expresión se mantuvo constante y su secreción presentó una tendencia a disminuir, esto no concuerda con los datos obtenidos por Schweyer, S y col. 2000, quienes reportan que hay un incremento en la expresión de esta citocina durante una infección crónica.

\*\*\*\*\*

Esta disminución nos puede indicar que el fármaco también posee actividades antiinflamatorias ya que la disminución de esta citocina puede ayudarnos a suponer que el fármaco está realizando esta función. No hay que olvidar que esta citocina también posee acción proinflamatoria, así que el que su secreción disminuya nos puede indicar que la lesión inflamatoria está siendo controlada y está disminuyendo.

\*\*\*\*\*

## 7.- CONCLUSION

En este trabajo se observó que tanto la expresión como la secreción de las citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  ) permanecieron sin cambio significativo en los pacientes que presentaron una lesión por virus de la hepatitis C, lo cual nos puede indicar que tanto la lesión como el agente causal de ésta siguen presentes en aquellos pacientes donde se detectaron valores mayores de 0.2 mEq/ml de VHC, mientras que en aquellos donde la carga viral disminuyó es posible pensar solo la lesión sigue presente. El que estas citocinas proinflamatorias estén presentes puede provocar que la IL-8 siga siendo expresada y secretada por los linfocitos, ya que estas citocinas proinflamatorias son capaces de inducir a la IL-8 en diversas células incluyendo los linfocitos, esto daría como resultado que los neutrófilos sigan siendo atraídos al sitio de la inflamación y haya una lesión. Ahora bien, algunos factores que pudieron influenciar en los resultados fueron las diversas enfermedades que presentaron los pacientes a lo largo del tratamiento, ya que estas pueden provocar una alteración en la expresión y secreción de las citocinas. Como en este trabajo las citocinas se midieron en los linfocitos, estos nos reflejan como se encuentran las citocinas a nivel sistémico y no solo como se encuentra el hígado, por lo que estos resultados pueden variar con lo reportado por otros investigadores.

La detección del virus de la hepatitis C circulante puede proveer una evidencia directa de la viremia y al monitorearse durante el tratamiento nos puede indicar una disminución en la concentración del virus lo que sugeriría una respuesta al fármaco.

En esta investigación no se obtuvo una correlación entre los valores de la carga viral y los valores de expresión y secreción de las citocinas a los 2 meses de estudio, esto puede deberse a que estos pacientes presentaron diversas enfermedades inflamatorias, las cuales pudieron haber influido en los resultados obtenidos para las diferentes citocinas, ya que tanto la expresión como la secreción fueron medidas en linfocitos, lo cual altera los resultados obtenidos, como ya se mencionó anteriormente, no permitiendo obtener una correlación correcta. También hizo falta correlacionar los valores de la carga viral al final del tratamiento con la expresión y secreción de las citocinas para saber si realmente se presentaba una correlación, esto no se realizó debido a que al inicio del tratamiento se pensó que a los dos meses se tendría una buena correlación.

## 7.- Conclusión

\*\*\*\*\*

Finalmente, después de analizar los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que el interferón- $\alpha$  presenta actividad inmunomoduladora y antiviral, y que tanto la pentoxifilina como la colchicina, presentan actividad inmunomoduladora. Esto a nivel sistémico, lo que no necesariamente refleja lo ocurrido a nivel hepático.

\*\*\*\*\*

**8.- BIBLIOGRAFIA**

- 1.-Alberti, A; Chemello, L; Benuegna, L. *Natural history of hepatitis C*. Journal of Hepatology. 1999. 31(1): 17-24.
- 2.-Angelico, A; Barlattani, A; Cepparulo, M; Guarascio, P; Sarrecchia, C; Liuti, A; Demin, F; Gentile, S, Sordillo, P; Hurtova, M; Angelico, F. *Colchicine worsens the efficacy of interferon-alpha in patients with chronic hepatitis interim report of a randomized pilot study*. Hepatology. 1998. 478 A.
- 3.-Andus, T; Bauer, J; Grerok, W. *Effects of cytokines in the liver*. Hepatology. 1991. 13(2): 364-375.
- 4.-Armendariz-Borunda, J; Seyer, JM; Postlethwaite, AE. *Kupffer cells from carbon tetrachloride-injured rat liver produce chematatic factors for fibroblast and monocytes: the role of tumor necrosis factor*. Hepatology. 1991. 14: 895-900.
- 5.-Assy, N; Minuk, GY. *Serum aspartate but not alanine aminotransferase levels help to predict the histological features of chronic hepatitis C viral infections in adults*. Am. J. Gastroenterol. 2000. 95(6): 1545-1550.
- 6.-Bellobuono, A; Tempini, S; Mondazzi, L; Gelosa, F; Mondini, C; Idéo, G. *Comparison between a personalized treatment and a standard interferon alpha therapy for chronic hepatitis C*. Hepatology. 1998. 478 A.
- 7.-Bienvenu, JAD; Monneret, G; Gutowsky, MCl; Fabien, N. *Cytokines assays in human sera and tissues*. Toxicology. 1998. 129: 55-61.
- 8.-Blum, HE. *Hepatitis viruses: genetic variants and clinical significance*. Int. J. Clin. Lab. Res. 1997. 27: 213-224.
- 9.-Castilla, A; Prieto, J; Fausto, N. *Transforming growth factors  $\beta$ 1 and  $\alpha$  in chronic liver disease. Effects of interferon therapy*. N. Engl. J. Med. 1991. 324: 933-940.

\*\*\*\*\*

- 10.- 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(5): 977-981.
- 11.-Chomczynski, P; Sacchi, N. *Single - step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol*. Anal. Biochem. 1987. 162: 156-159.
- 12.-Colletti, LM; Remick, DG; Burtch, GD. *Role of tumor necrosis factor in the pathophysiologic alterations after ischemis/reperfusion injury in the rat*. J. Clin. Invest. 1990. 85: 1936 -1943.
- 13.-Conjeevaram, H; Everhart, J; Hoofnagle, J. *Predictors of a sustained beneficial response to interferon alpha in chronic hepatitis C*. Hepatology. 1995. 22: 1326-1329.
- 14.-Critchley, J; Critchley, L; Yeung, E, Young, RJ; Chan, T; Goh, V. *Granulocyte-colony stimulating factor in the treatment of colchicines poisoning*. Human and Experimental Toxicology. 1997. 16: 229-232.
- 15.-DeMaeyer, E; DeMaeyer-Guignard, J. *Interferons*. En *The Cytokine Handbook*. Editorial Academic Press. 3° edición. 1998. E.U.A.
- 16.-Deviere, J; Content, J; Denys, C. *Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis*. Hepatology. 1991. 11: 628-634.
- 17.-Dinarello, CA. *Interleukin-1*. En *The Cytokine Handbook*. Editorial Academic Press. 2° edición. 1994. E.U.A.
- 18.-Friedman, SL. *The cellular basis of hepatic fibrosis*. N. Eng. J. Med. 1993. 328(2): 1828-1835.
- 19.-Friedman, SL. *Cytokines and fibrogenesis*. Semin. Liver. Dis. 1999. 19(2): 129-140.
- 20.-Greenwel, P; Geerts, A; Ogata, I; Solis-Herruzo, JA; Rojkind, M. *Liver Fibrosis*. En *The Liver: Biology and Pathobiology*. Editorial Raven Press. 3° edición. 1994. E.U.A.

\*\*\*\*\*

- 21.-Hassan, G, Moreno, S; Massimi, M; DiBiagio, P; Stefanini, S. *Interleukin-1-producing plasma cells in close contact with hepatocytes in patients with chronic acute hepatitis*. Journal of Hepatology. 1997. 27: 6-17.
- 22.-Hill, D, Shedlofsky, S; McClain, C; Mae, A; Tsukamoto, H. *Cytokines and liver disease*. En *Cytokines in health and disease*. Editorial Daniel Remick and Jonathan Friedland. Marcel Dekker, Inc. 2º edición. 1997. E.U.A.
- 23.-Kershenobich, D; Uribe, M; Suárez, G; Mata, JM; Pérez-Tamayo, R; Rojkind, M. *Treatment of cirrhosis with colchicine*. Gastroenterology. 1979. 77: 532-536.
- 24.-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(2): 315-321.
- 25.-Khoruts, A; Stahnke, L; McClain, CJ. *Circulating tumor necrosis factor, interleukin 1 and interleukin 6 concentrations in chronic alcoholic patients*. Hepatology. 1991. 13: 267-276.
- 26.-Knittel, T; Müller, K; Saile, B; Romadori, G. *Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells*. Journal of Hepatology. 1997. 27: 1067-1080.
- 27.-Kowdley, KU. *TNF- $\alpha$  in chronic hepatitis C: the smoking gun?* Am. J. Gastroenterol. 1999. 94(5): 1132-35.
- 28.-Larrea, E; García, N; Quian, C; Civiera, P; Prieto, J. *Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C*. Hepatology. 1996. 23: 210-217.
- 29.-Lee, MH; Hahm, JS; Choi, CS; Kim, JB; Park, GT; Jung, JW; Lee, JW. *Clinical study of the effect colchicine treatment in chronic liver disease*. Hepatology. 1998. 724 A.

\*\*\*\*\*

30.-Lee, KS; Cottam; HB; Mougnum, K; Wasson, DB; Carson, D; Ohojkier, M. *Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitor activity.* Am. J. Physiol. 1997. 273: G 1094-1100.

31.- Llorente, L; Richaud-Patin, Y; Alcocer-Castillejos, N; Ruiz-Soto, R; Mercado, M; Orozco, H; Gamboa-Domínguez, A; Alcocer-Varela, J. *Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver.* Journal of Hepatology. 1996. 24: 555-563.

32.-Mahalingam,S; Karupiach, G. *Chemokines and chemokine receptors in infections diseases.* Immunol. Cel. Biol. 1999. 77(6): 469-475.

33.-Mallat, A; Preaux, AM; Blazejewski, S; Rosembaum, J; Ahumeaux, D; Mavier, P. *Interferon alfa y gamma inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture.* Hepatology. 1995. 21: 1003-1010.

34.-Matsuda, Y; Matsumoto, K; Yamada, A; Ichida, T; Asakura, H; Komoriya, Y; Nishijama, E; Nakamura, T. *Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis.* Hepatology. 1997. 26: 81-89.

35.-Mavier, P; Mallat, A. *Perspectives in the treatment of liver fibrosis.* Journal of Hepatology. 1995. 22(2): 111-115.

36.-Miller, LC, Kaplan, MM. *Serum interleukin-2 and tumor necrosis factor in primary billiar cirrhosis: decreased by colchicine and relationship to HLA-DR4.* Am. J. Gastroenterol. 1992. 87(4): 465-470.

37.-Missale, G; Ferrari, C; Fiaccadori, F. *Cytokine mediators in acute inflammation and chronic course of viral hepatitis.* Ann. Ital. Med. Int. 1995. 10(1): 14-18.

38.-Muir, AJ. *The natural history of hepatitis C viral infection.* Semin. Gastrointest. Dis. 2000. 11(2): 54-61.

\*\*\*\*\*

39.-Nagakawa, J; Hishinuma, Y; Hirota, K. *Involvement of tumor necrosis factor in the pathogenesis of activated macrophages-mediated hepatitis in mice.* Gastroenterol. 1990. 99: 758-765.

40.- Nakagawa, H; Shimomura, H; Hasui, T; Tsuji, H; Tsuji, T. *Quantitative detection of hepatitis C virus genome in liver tissue and circulation by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction.* Dig. Dis. Sci. 1994. 39(2): 225-233.

41.-Naidus, RH; Rodviern, R; Mielke, CA. *Colchicine toxicity.* Arch. Intern. Med. 1977. 137: 394-396.

42.-Napoli, J; Bishop, A; Mc Caughan, W. *Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukin 2, 6 and 8 in human cirrhosis.* Gastroenterology. 1994. 107: 789-798.

43.-Neuner, P; Klosner, G; Schauer, E. *Pentoxifylline in vivo down-regulates the releases of IL-1B, IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor alpha by human peripheral blood mononuclear cells.* Immunology. 1994. 83: 262-267.

44.-Noel, P; Elson, S; Bokulic, R. *Pentoxifylline inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality.* Life Science. 1990. 47: 1023-1029.

45.-Peterson, TC. *Pentoxifylline prevents fibrosis in an animal model and inhibits platelet derived growth factor driven proliferation of fibroblast.* Hepatology. 1993. 17: 486-493.

46.-Preaun, AM; Mallat, A; Rosenbaun, J; Zafran, ES. Mavier, P. *Pentoxifylline inhibits growth and collagen synthesis of cultured human hepatic myofibroblast-like cells.* Hepatology. 1997. 26: 315-322.

47.-Qian, C; Camps, J; Malvenda, MD; Civeira, MP; Prieto, J. *Replication of hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells. Effect of alpha-interferon therapy.* Journal of Hepatology. 1992. 16: 380-382.

48.-Ramadori,G; Meyer, B. *Liver cells and citokines.* Cur. Op. Gastroenterol. 1993. 9: 359-366

\*\*\*\*\*

- 49.-Reed, WR; DeGowin. *Suppressive effects of pentoxifylline on natural killer cell activity.* J. Lab. Clin. Med. 1992. 119(6): 763-771.
- 50.-Romanelli, RG; Caligiuri, A; Carloni, V; De Franco, R; Montal, P, Ceni, E; Casini, A; Gentilini, P; Pinzani, M. *Effects of pentoxifylline on the degradation of procollagen type I produced by human hepatic stellate cells in response to transforming growth factor- $\beta$ .* Br. J. Pharmacol. 1997. 122(6): 1047-1054.
- 51.-Sakaida, I; Uchida, K; Matsumura, Y; Okita, K. *Interferon gamma treatment prevents procollagen gene expression without affecting transforming growth factor- $\beta_1$  expression in pig serum-induced rat liver fibrosis in vivo.* Journal of Hepatology. 1998. 28: 471-479.
- 52.-Sanchez-Tapias, JM. *Hepatitis crónica por virus de la hepatitis.* Tratamiento de las enfermedades hepáticas. Asociación Española para el estudio del hígado. 1997.
- 53.- Schmidt, W; Wu, P; Brashear, D; Klinzman, D; Perino, MJ; LaBrecque, DR; Stapleton, J. *Effect of interferon therapy on hepatitis C virus RNA in whole blood, plasma and peripheral blood mononuclear cells.* Hepatology. 1998. 28: 1110-1116.
- 54.-Simmonds, P; Zhang, H; Watson, S; Rebus, e, Ferguson, P; Balfe, G; Leadbetter, P; Yap, J; Peutherer, F; Ludlam, C. *Hepatitis C quantification and sequencing in blood products, haemophiliacs and drug users.* Lancet. 1990. 336: 1496-1472.
- 55.-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.
- 56.-Shimoda, K; Begun, NA; Shibuta, K; Mori, M; Bonkovsky, HL; Banner, BF; Barnard, GF. *Interleukin-8 and hI RH(SDF1- $\alpha$ /PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C.* Hepatology. 1998. 28: 108-115.

\*\*\*\*\*

57.-Tassopoulos, NC. *Treatment of patients with chronic hepatitis C and normal ALT levels*. Journal of Hepatology. 1993. 31: 193-196.

58.-Thiele, DL. *Tumor necrosis factor, the acute phase response and the pathogenesis of alcoholic liver disease*. Hepatology. 1989. 9(3): 497-499.

59.- Trimoulet, P; Bernard, PH; De Ledinghen, V; Oui, B; Chene, G; Saint-Marc, MF; Dantin, S; Couzigou, P; Fleury, H. *Quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis treated with interferon- $\alpha$* . Dig. Dis. Sci. 2000. 45: 175-181.

60.-Villalobos, JJ. *Introducción a la Gastroenterología*. Editor Francisco Méndez Oteo. 1º edición. 1988. México, D.F.

61.-Villalobos, JJ, Valdovinos, MA; Olivera, MA. *Principios de Gastroenterología*. Editor Mendez. 1º edición . 2000. México, D.F.

62.-Vilcek, J; Le, J. *Immunology of cytokines: An introduction*. En The Cytokine Handbook. Editorial Academic Press. 2º edición. 1994. E.U.A.

63.-Walker, MA. *Hepatitis C virus: an overview of current approaches and progress*. Drug. Discov. Today. 1999. 4(11): 518-29.

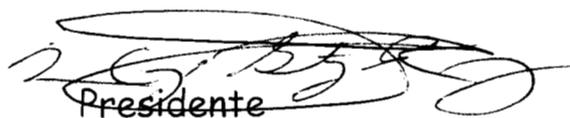
64.-Ward, A; Clissord, SP. *Pentoxifylline. Review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and its therapeutic efficacy*. Drugs. 1987. 34: 50-97.

65.-Weiner, FR; Giambrone, MA; Czaja, MJ. *Ito-cell gene expression and collagen regulation*. Hepatology. 1990. 11: 111-117.

66.-Windmeier, C; Gressner, A.M. *Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis*. Gen. Pharmacol. 1997. 29(2): 181-196.

67.-Zein, NN. *Interferons in the management of viral hepatitis*. Cytokines Cellular and Molecular Therapy. 1998. 4: 229-241.

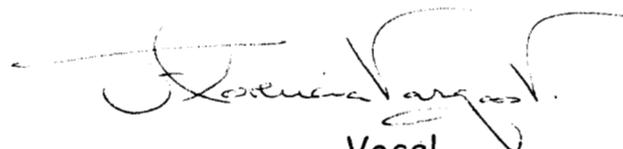
Este trabajo de tesis fue aprobado por el Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud el día 27 de Abril del 2001.



Presidente



Secretario



Vocal

