

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

**“Nivel de Expresión de la Proteína 2 de Múltiple
Resistencia a Drogas (MRP-2) en un Grupo de
Pacientes con Hepatitis C”**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada(o) en Nutrición

P R E S E N T A

Elizabeth Sosa Castillo

M en C. Ma. Sara Sixtos Alonso

Pachuca, Hgo., Fecha (mes/año)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Nivel de Expresión de la Proteína 2 de Múltiple Resistencia a Drogas (MRP-2) en un Grupo de Pacientes con Hepatitis C"

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta la Pasante

C. Elizabeth Sosa Castillo

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo., 28 de Mayo del 2008
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE DEL JURADO	DRA. YOLANDA SÁNCHEZ MONJARAZ
SECRETARIO DE JURADO	DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
1er. VOCAL DEL JURADO	DR. HUGO NÁJERA PEÑA
2º VOCAL DEL JURADO	M. EN C. MA. SARA SIXTOS ALONSO
3er. VOCAL DEL JURADO	DR. JOSÉ ANTONIO MORALES GONZÁLES
SUPLENTE	QFB. ZURISSADAI BETANZOS PALMEROS
SUPLENTE	L. NUTR. GUADALUPE HERNÁNDEZ GÓMEZ

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está dedicada a mis padres, quien en todo momento me han brindado su apoyo, comprensión y amor incondicional, pero sobre todo me han guiado en cada etapa de mi vida con sus palabras de fortaleza y confianza, que me han hecho crecer y disfrutar cada momento como si fuera el último.

Gracias a mis hermanas y abuelita por su amor y apoyo que me brindaron en esta carrera en la cual he logrado llegar a la meta, con tanta felicidad y entusiasmo.

Agradezco a Dios por permitirme lograr uno de mis más grandes anhelos y por todas las bendiciones que me ha regalado en esta vida.

Así, como también quisiera agradecer al Dr. Aarón por confiar en mí y brindarme su tiempo, apoyo y conocimientos que me han hecho crecer profesionalmente.

También quiero dar las gracias a mi asesora Sara por todo su apoyo, comprensión, tiempo y por brindarme sabias palabras que me guiaron en este camino del conocimiento.

Agradezco a mis compañeros, investigadores y personal de laboratorio, por su amistad y confianza, por todos aquellos momentos de alegría que hacían de un día triste, un hermoso día.

Finalmente quisiera dar las gracias al niño al que amo, el cual me ha apoyado y regalado su amor más allá de la distancia y del tiempo. Y con el cual he aprendido que en la vida diaria no hay límites que no se puedan superar, mientras haya esa chispa que es la pasión que te hace lograr todo aquello que en la mente parece imposible.

Nunca consideres el estudio como un deber,
sino como una oportunidad para penetrar en el maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

INDICE

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Epidemiología	3
4. Historia de la enfermedad	4
5. Vías de transmisión del VHC	5
5.1 Grupos de alto riesgo	6
6. Diagnóstico	6
6.1. Diagnóstico serológico	6
6.2. Diagnóstico molecular	7
7. Virus de la Hepatitis C (VHC)	7
7.1 Organización genómica del VHC	8
8. Variabilidad genética del VHC	10
9. Replicación viral	11
10. Defensa inmune ante la infección por VHC	13
11. Tratamiento	15
11.1 Criterios para el manejo terapéutico de la Hepatitis C	16
11.2. Interferón	17
11.3. Ribavirina	21
11.4. Posología del tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina	23
11.5. Respuesta al tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina	24
12. Mecanismo de resistencia al tratamiento	25
12.1 Proteínas de múltiple resistencia a drogas de unión a ATP (MRP'S /ABC)	25
12.2 Gen MRP-2/ABCC2	26

12.3 Distribución en tejidos de MRP-2	27
12.4 Estructura y actividad de MRP-2	27
12.5 Sustratos de MRP-2	30
12.6 MRP-2 y VHC	31
13. Problema de Investigación	32
13.1 Justificación	33
13.2 Hipótesis, Objetivo general y Objetivos específicos	34
13.3 Metodología	35
13.4 Diagrama de Flujo	36
13.5 Esquema de tratamiento antiviral	37
13.6 Reactivos	38
13.7 Equipo y material de laboratorio	40
14. Métodos	41
15. Resultados	45
16. Figuras	51
17. Discusión	59
18. Conclusiones	63
19. Referencias bibliograficas	63
20. Anexos	69

Índice de Tablas

Tabla 1. Sustratos afines a MRP-2	30
Tabla 2. Población de estudio	45
Tabla 3. Número de copias de ARN-VHC	48
Tabla 4. Expresión de MRP-2/GADPH en relación a la respuesta al tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina	49
Tabla 5. Expresión de MRP-2/GADPH en relación al Genotipo	49
Tabla 6. Lista de genes ABCC humano	70

Índice de Figuras

Figura 1. Historia natural de la enfermedad	5
Figura 2. Principales vías de transmisión del VHC identificados en México	6
Figura 3. Estructura del VHC	8
Figura 4. Organización del genoma del VHC	9
Figura 5. Distribución geográfica de los genótipos del VHC en el mundo	11
Figura 6. Ciclo replicativo del VHC	12
Figura 7. Estructura del gen MRP-2	26
Figura 8. Modelo común de la topología de membrana de la familia MRP.	28
Figura 9. Vía de transporte de sustratos por MRP-2	29
Figura 10. ARN total de tejido hepático en gel de agarosa al 1.5 %	46
Figura 11. Curva estándar para la cuantificación de ARN-VHC	47
Figura 12. Regresión lineal del logaritmo de la concentración del plásmido.	47
Figura 13. Curvas de amplificación de MRP-2 y GADPH en tejido hepático con VHC en condiciones basales.	50

Figura 14. Curvas de amplificación de MRP-2 y GADPH en tejido hepático con VHC al término del tratamiento antiviral.	50
Figura 15. Número de copias de ARN-VHC en tejido hepático previa al tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.	51
Figura 16. Número de copias del ARN-VHC en tejido hepático a 6 meses de concluir el tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.	52
Figura 17. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC, respuesta viral sostenida al tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.	53
Figura 18. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes sin respuesta viral sostenida al tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.	54
Figura 19. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC portadores con genotipo 1.	55
Figura 20. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC portadores con genotipo diferente 1.	56
Figura 21. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC portadores con genotipo 1 y pacientes portadores con genotipo diferente 1 (2, 3 y 5), al inicio del tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.	57
Figura 22. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC portadores con genotipo 1 y genotipo diferente 1 (2, 3 y 5), al final del tratamiento.	58
Figura 23. Secuencias nucleotídicas del ARNm de MRP-2.	69

1. RESUMEN

El virus de la hepatitis C (VHC) causa daño hepático crónico el cual se ha asociado con la desregulación de la expresión de proteínas de resistencia a múltiples drogas (multidrug resistance proteins, MRP's). La MRP-2 tiene un papel muy importante en los procesos de detoxificación y quimioprotección de la célula. El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de expresión de MRP-2 biopsias hepáticas por PCR- tiempo real y su relación con la respuesta al tratamiento en estos pacientes. Se amplificó la secuencia del gen blanco de 62pb con sondas Taqman y de un gen de referencia Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GADPH). Se determinó el número de copias del ARN-VHC. De los 30 pacientes analizados: 11 tuvieron respuesta viral sostenida (RVS) al tratamiento y 19 no tuvieron respuesta viral sostenida (No RVS). El promedio del número de copias del ARN-VHC basal en cada grupo fue de 372,323 copias/reacción (5.5 log) y de 1,316139 (6.1 log) respectivamente. En la segunda biopsia el número de copias del ARN-VHC fue no detectable en el grupo de pacientes con RVS y en el grupo de No RVS la carga viral disminuyó en significativa de 1,316139 a 513,505 copias/reacción, sin embargo la replicación viral se mantuvo constante. La expresión relativa de MRP-2 se analizó por tipo de respuesta al tratamiento y genotipo del VHC. En función a la respuesta viral, la expresión de MRP-2 se mantuvo constante tanto en condiciones basales en pacientes con RVS y en pacientes sin RVS (10.9 ± 9.9 vs 19.5 ± 20.9) como en postratamiento (16.1 ± 28.9 vs 15.0 ± 13.3), ($p=0.646$ y $p=0.687$) respectivamente. En relación al genotipo y la expresión de MRP-2, los pacientes con genotipo diferente a 1 tuvieron niveles de expresión de MRP-2 menores que los pacientes con genotipo 1 en condiciones basales ($p=0.012$), sin embargo después del tratamiento antiviral no hay diferencia ($p=0.176$). A MRP-2 se le ha atribuido un papel muy importante en el mecanismo de resistencia a fármacos en enfermedades neoplásicas e infecciones virales, sin embargo, en éste grupo de pacientes con VHC no muestra un papel reelevante en cuanto a la respuesta antiviral, probablemente ésto se deba a que el efecto antiviral del PEG-INF se da a nivel de receptores y que el efecto intracelular de la ribavirina no este modificado por la actividad de MRP-2.

Palabras clave: Virus de la hepatitis C, MRP-2, resistencia al tratamiento antiviral y respuesta viral sostenida.

2. ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) infection cause hepatic damage has been associated with the deregulation of multiple drugs resistance protein (MRP's) expression. MRP-2 has a very important role in the detoxification processes and quimioprotect of the cell. Our aim was evaluated to expression of the MRP-2 in percutaneous liver biopsy specimens. The sequence of the white gene of 62 bp was amplified with Taqman probe library soundings and was amplified the reference gene Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GADPH). We obtained the number of copies of the HCV-RNA from the cDNA. Of the 30 analyzed patients with HCV: 11 patients had sustained virological response (SVR) and 19 were Non responders (NR). The average of the number of copies of the basal HCV-RNA in each group was of 372,323 copies for reaction (5.5 log) and of 1,316139 (6.1 log) respectively. In the second percutaneous liver biopsy specimen the number of copies of the HCV-RNA was undetectable in the group of patients with SVR and the group of NR the load decreased in significant form of 1,316139 to 513,505, but the viral replication stayed. The relative expression of MRP-2 was analyzed by type of answer to the treatment and genotype of the HCV. In function to the viral answer the MRP-2 expression stayed constant at the beginning of the treatment, in patients with SVR as in patients NR (10.9 ± 9.9 vs 19.5 ± 20.9) and end of the treatment (16.1 ± 28.9 vs 15.0 ± 13.3), ($p=0.646$ y $p=0.687$) respectively. The patients with genotype $\neq 1$ had levels of the expression of MRP-2 smaller than those patients with genotype 1, before the antiviral treatment ($p= 0.012$), nevertheless at the end antiviral treatment there is no difference ($p=0.176$). The MRP-2 has attributed a very important role to the mechanism of resistance to drugs in neoplasics diseases and viral infections, nevertheless, in this one group of patients with HCV do not show a relevance role for the antiviral answer, are possible that this must to that the antiviral effect of PEG-IFN occurs to level of receptors and although the ribavirin if has a greater intracellular effect but doesn't modified by the activity of this protein.

Key words: Hepatitis C virus, MRP-2, resistance to the antiviral treatment and response viral sustantial.

MARCO TEORICO

3. EPIDEMIOLOGÍA

El virus C (VHC) es uno de los principales agentes etiológicos de enfermedad hepática crónica, la cual que se caracteriza por el desarrollo de fibrosis, cirrosis, hepatocarcinoma y muerte.

En 1883 Lurman describió una hepatitis transmitida por sangre y productos sanguíneos, los agentes etiológicos identificados fueron virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis A en 1973.¹ Sin embargo, se describió un cuadro de hepatitis postransfusional no asociado al virus A ni al virus B, al cual inicialmente se le denominó hepatitis no A y no B (NANBH). En 1987, científicos dirigidos por Daniel W. Bradley y Michael Houghton de Chiron secuenciaron el genoma del virus C emplearon métodos de ingeniería genética especializada que permitió decodificar la secuencia de aminoácidos y proteínas a partir de las propiedades bioquímicas del ARN viral.⁽²⁾

Se estima que el 90% de las infecciones hepáticas postransfusionales están asociadas al virus C.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que 200 millones de personas, (3%) de la población mundial, se encuentra infectada por el VHC, de las cuales 4 millones se localizan en EUA y 5 millones en Europa. Mientras que en México la prevalencia de la infección es de 1.2 millones (1.4 %) de la población.⁽³⁾

4. HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

El período de incubación del VHC es de 6 a 12 semanas. La fase aguda de la infección dura aproximadamente 7 semanas.⁽⁴⁾ (Figura. 1). El 80 a 85% de las personas infectadas que no eliminan el virus dentro de los primeros 6 meses de la infección quedan como portadores crónicos del VHC. Esta población desarrollará daño hepático crónico progresivo en un período de 10 a 25 años, el cual se caracteriza por; inflamación hepática crónica, desarrollo de fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma. En algunos casos sobreviene la muerte por falla hepática. El cuadro clínico en la fase aguda es asintomático y durante los primeros años de la infección crónica los signos y síntomas que se presentan son inespecíficos como: náusea, fatiga, fiebre, dolor de cabeza, vómitos, pérdida de apetito, dolor, dolores musculares, articulares y en algunos casos ictericia.⁽⁵⁾ Durante este tiempo la elevación intermitente de la Alanino amino transferasa (ALT) es el único signo inespecífico de daño hepático, por lo cual se dificulta la detección del VHC en estadios tempranos de la infección. En estadios avanzados de la enfermedad también se presentan manifestaciones extrahepáticas que se deben principalmente a la presencia de complejos inmunes circulantes, formados por antígenos virales y anticuerpos que junto con el complemento, tienden a depositarse en la pared de los vasos sanguíneos provocando vasculitis cutáneas, crioglobulinemia, porfiria cutánea tardía, glomerulonefritis membrano-proliferativa, trombocitopenia, tiroiditis, linfomas, encefalopatía, hipertensión portal y falla hepática.⁽⁶⁾ La progresión del daño hepático crónico es variable y se ha asociado a factores como el consumo de alcohol, coinfección con virus de la hepatitis B y VIH, mayor edad al momento de la infección y género masculino.



Figura 1. Historia natural de la enfermedad. La evolución de la infección crónica por virus C se caracteriza por inflamación hepática crónica, el desarrollo de fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma y factores asociados con la progresión de la enfermedad. ⁽⁷⁾

5. VÍAS DE TRANSMISIÓN DEL VHC

Las principales vías de transmisión del VHC reconocidas en nuestra población son ⁽⁸⁾ (Figura. 2):

- Vía parenteral: por transfusión de sangre o sus derivados (plasma, concentrado eritrocitario, plaquetas, factores de coagulación, albúmina).
- Trasplante de órganos infectados con VHC.
- Equipo de diálisis en pacientes nefrópatas.
- Transmisión vertical madre-hijo, en mujeres infectadas con VHC y elevado número de copias del ARN-VHC, al momento del parto.
- Uso de jeringas contaminadas entre usuarios de drogas de administración intravenosa.
- Punción accidental con agujas contaminadas
- Transmisión sexual: es una vía poco frecuente, aunque es importante en personas promiscuas.

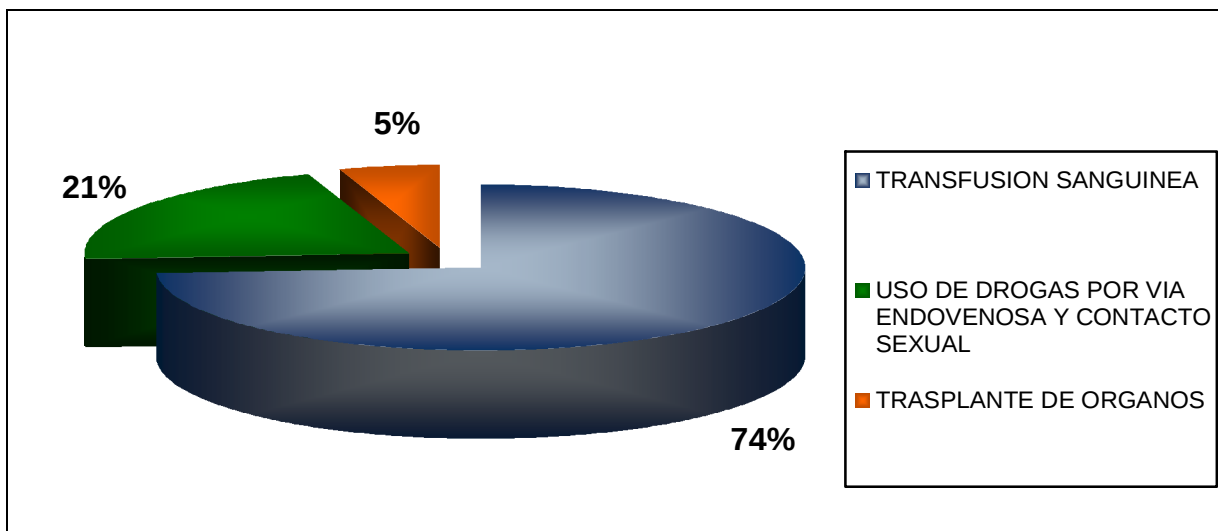


Figura 2. Principales vías de transmisión del VHC identificados en México.⁽⁶⁾

5.1 Grupos de alto riesgo

Los grupos de alto riesgo para adquirir la infección del VHC son: pacientes receptores de transfusiones sanguíneas, trasplante, hemodializados, hemofílicos, adictos intravenosos, neonatos de madres infectadas, personal de salud (médicos patólogos, químicos, enfermeras, etc.) y sexoservidoras (es).

6. DIAGNÓSTICO

6.1 Diagnóstico serológico

Ante la sospecha de infección crónica por VHC se realiza una prueba de escrutinio en sangre periférica por ensayo inmunoenzimático (assay immunoenzymatic, EIA) y el resultado es confirmado con una prueba confirmatoria. El estudio serológico pone de manifiesto el contacto con el virus C por la presencia de anticuerpos frente a diferentes antígenos constitutivos y no constitutivos del virus C.⁽⁶⁾

6.2 Diagnóstico molecular

El diagnóstico del VHC basado en métodos moleculares como es la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), permite identificar y cuantificar el número de copias del ARN-VHC, que en la clínica se denomina usualmente como carga viral y se emplean como sinónimos. Esta prueba se realiza en sangre periférica y aunque no es una determinación de rutina también se puede realizar en tejido hepático.⁽⁶⁾

Por medio de ésta prueba se determina si el virus se encuentra en fase de replicación viral, así como el genotipo del VHC responsable de la infección.

7. VIRUS DE LA HEPATITIS C

El genoma del VHC es un ARN de cadena sencilla, esta rodeado por una cápside icosaédrica (nucleocápside) conformado por la proteína central o core y una envoltura lipídica que contiene 2 glicoproteínas E1 y E2.⁽⁸⁾ (Figura. 3). Debido a que el VHC tiene una envoltura lipídica, es lábil a solventes oleosos, calentamiento, tratamiento con formol y exposición a luz ultravioleta.⁽⁶⁾ La partícula viral tiene aproximadamente 50 nm de diámetro y la estructura central o core es de aproximadamente 30 nm. Por sus características estructurales y organización genómica, el VHC pertenece a la familia *Flaviviridae* del género *hepacivirus*. El ARN viral es monocatenario, lineal, de polaridad positiva constituido por un solo marco de lectura abierto (open reading frame, ORF) de 9,600 nucleótidos, el cual codifica para una lipoproteína de 3,000 aminoácidos a partir de la cual se producen tres proteínas estructurales (nucleocápside, E1, E2) y siete proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4 y NS5). Dos regiones no codificantes limitan ambos extremos del genoma 5' y 3' (Untranslate region, 5' and 3' UTR).⁽⁹⁾

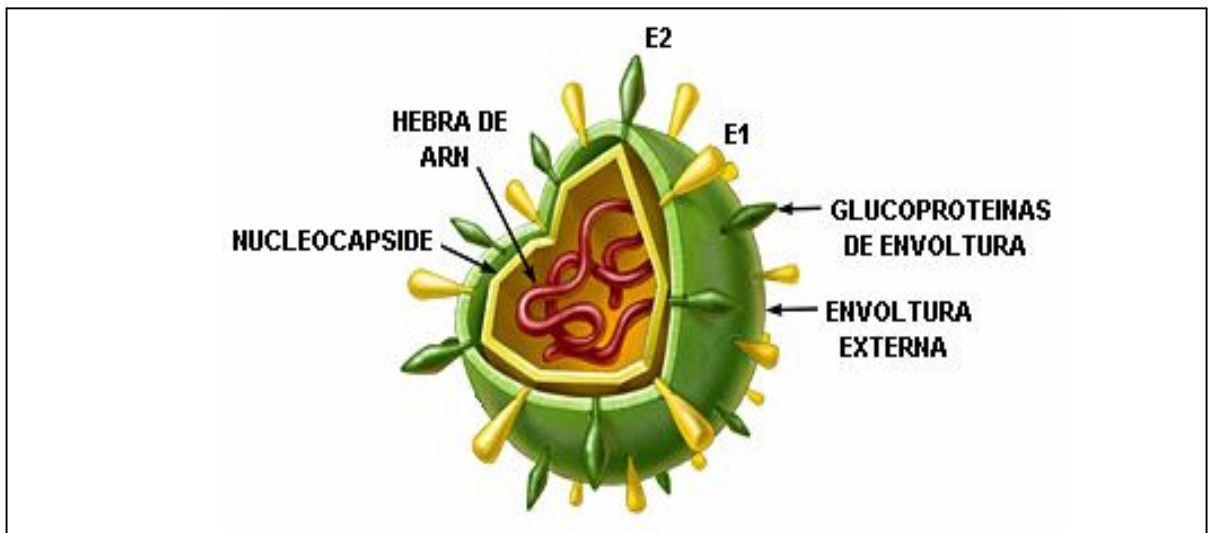


Figura 3. Estructura del VHC. El genoma del virus C es una hebra de ARN, rodeado por una nucleocápside y una envoltura lipídica que contiene dos glicoproteínas E1 y E2. ⁽¹⁰⁾

7.1 Organización genómica del VHC

La región no codificante 5'UTR contiene 341 bases que precede el codón de la traducción de la lipoproteína. Esta secuencia es altamente conservada, con una similitud superior al 98% entre todas las cepas hasta ahora secuenciadas, probablemente contiene importantes lugares para la traducción, replicación y ensamblaje del genoma. Su principal función es permitir la unión del ARN viral con los ribosomas de la célula a través de la región conocida como sitio de entrada al ribosoma (internal ribosome entry site, IRES). El ORF del VHC termina en un final único y continua con la región no codificadora 3'-UTR, de 27-51 bases. ⁽¹¹⁾

La región C codifica para la proteína central o core; las secuencias E1 y E2 codifican las glicoproteínas de la envoltura del virus, las cuales contienen diferentes sitios de glicosilación.

La secuencia E2 traduce dos proteínas, la E2 y la p7. La secuencia NS3 codifica para las proteínas serina y helicasa.⁽¹²⁾ La proteína codificada por NS4A actúa como un cofactor de la proteína serina NS3 y la función de la p27, derivada de la secuencia NS4B, es desconocida. El transcrito de NS5A no se conoce muy bien su función, aunque se ha propuesto que puede estar involucrado en la resistencia al interferón y la proteína de la región NS5B tiene actividad de ARN dependiente de ARN polimerasa (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) de vital importancia para la replicación del genoma viral. (Figura. 4)⁽¹²⁾

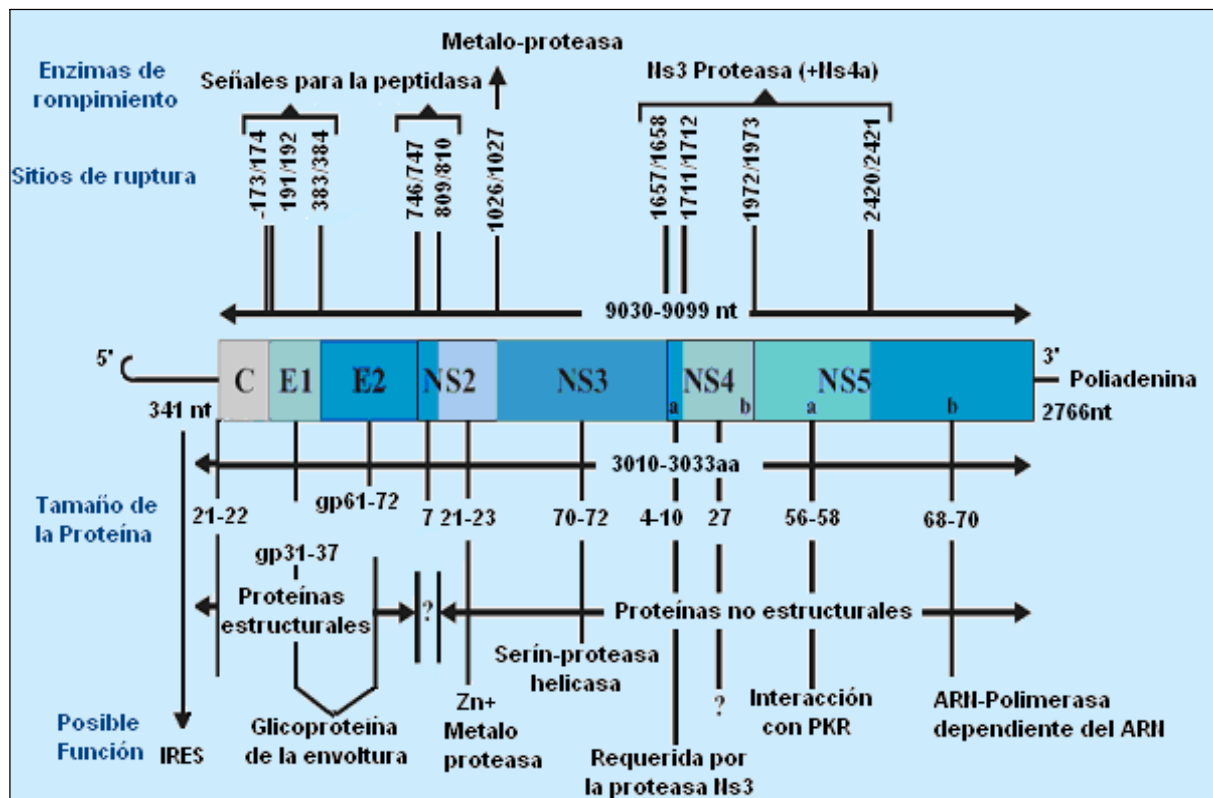


Figura 4. Organización del genoma de VHC. Localización de las proteínas estructurales (core, E1, E2) y no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4 y NS5) y dos extremos no codificantes del genoma (5'UTR y 3'UTR).⁽⁹⁾

8. VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS C

Una característica muy importante del VHC, es el alto grado de heterogeneidad en su genoma y por lo tanto, de las proteínas codificadas. Esta característica tiene implicaciones importantes en la patogenia y persistencia del virus, así como en el desarrollo de mutantes resistentes al tratamiento, en el diseño e interpretación de métodos de diagnóstico y vacunas.⁽¹³⁾ La elevada cinética de replicación viral y la baja fidelidad de RdRp son factores que explican la elevada variabilidad genética de este virus. El virus C tiene una vida media de 2.5 h en la sangre y existe una elevada producción diaria de partículas virales (10^{12} /día) en los pacientes con infección crónica.⁽¹³⁾

La enzima que se encarga de la replicación del genoma viral tiene una tasa de error aproximada de 10^{-4} y el genoma viral no tiene un mecanismo de reparación de error.⁽¹³⁾ El virus C se ha clasificado en genotipos, subtipos y cuasiespecies; se denominan genotipos a aquellos variantes del genoma viral que tienen un grado de similitud en su secuencia entre el 66-69% y se designan con un número arábigo (1, 2, 3...), hasta el momento se han descrito 6 genotipos mayores de interés clínico. En los subtipos este grado de similitud es del 77 a 80% y se designan con una letra minúscula del abecedario (a, b, c...) que seguirá al número del genotipo; a la fecha se han descrito más de 100 subtipos distintos⁽¹⁴⁾.

Las cuasiespecies se definen como la mayor heterogeneidad genética del virus presente en el mismo individuo y el grado de similitud entre estas variantes es hasta del 95%. La prevalencia geográfica del virus por genotipo es variable, por ejemplo en España, Europa y Norteamérica el genotipo predominante es el 1 (70%) seguido del 2 y del 3 (25%).⁽¹⁴⁾ En zonas de Asia y Japón predominan los genotipos 2 y 3, mientras que en la zona central de África es más frecuente el genotipo 4. En México el genotipo 1 es el de mayor prevalencia y de mayor importancia clínica en nuestra población (Figura. 5), debido a que se ha asociado con el peor pronóstico clínico de la enfermedad y se ha reconocido la vía parenteral como la principal vía de transmisión del virus C.

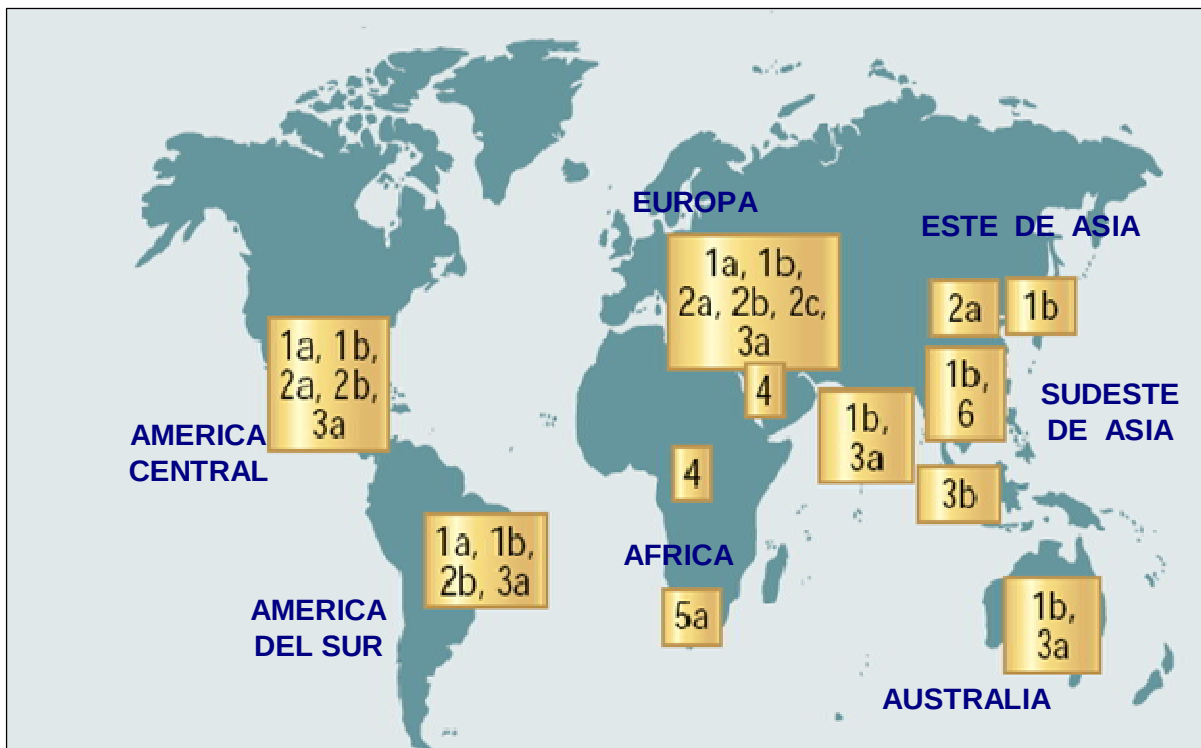


Figura 5. Distribución geográfica de los genotipos del VHC en el mundo. El genotipo 1 es el de mayor importancia clínica en el mundo, ya que se ha asociado con el peor pronóstico clínico de la enfermedad. ⁽⁷⁾

9. REPLICACIÓN VIRAL

La principal célula huésped del virus C es el hepatocito aunque también se ha localizado en otros tipos de célula como son; las células epiteliales, monocitos y células dendríticas, entre otros. Se ha propuesto que el virus C entra a la célula por un mecanismo de endocitosis mediada por receptores inespecíficos como el de la tetraspanina CD81, el receptor tipo scavenger de clase B tipo 1 (scavenger receptor class B type I, SRBI), el receptor de señal de células dendríticas (mannose-binding lectins, DC-SIGN). ⁽¹⁵⁾ Una vez en el interior de la célula, el ARN se libera y desdobra en el citoplasma de la célula y se une a los ribosomas a través del IRES. (Figura. 6).

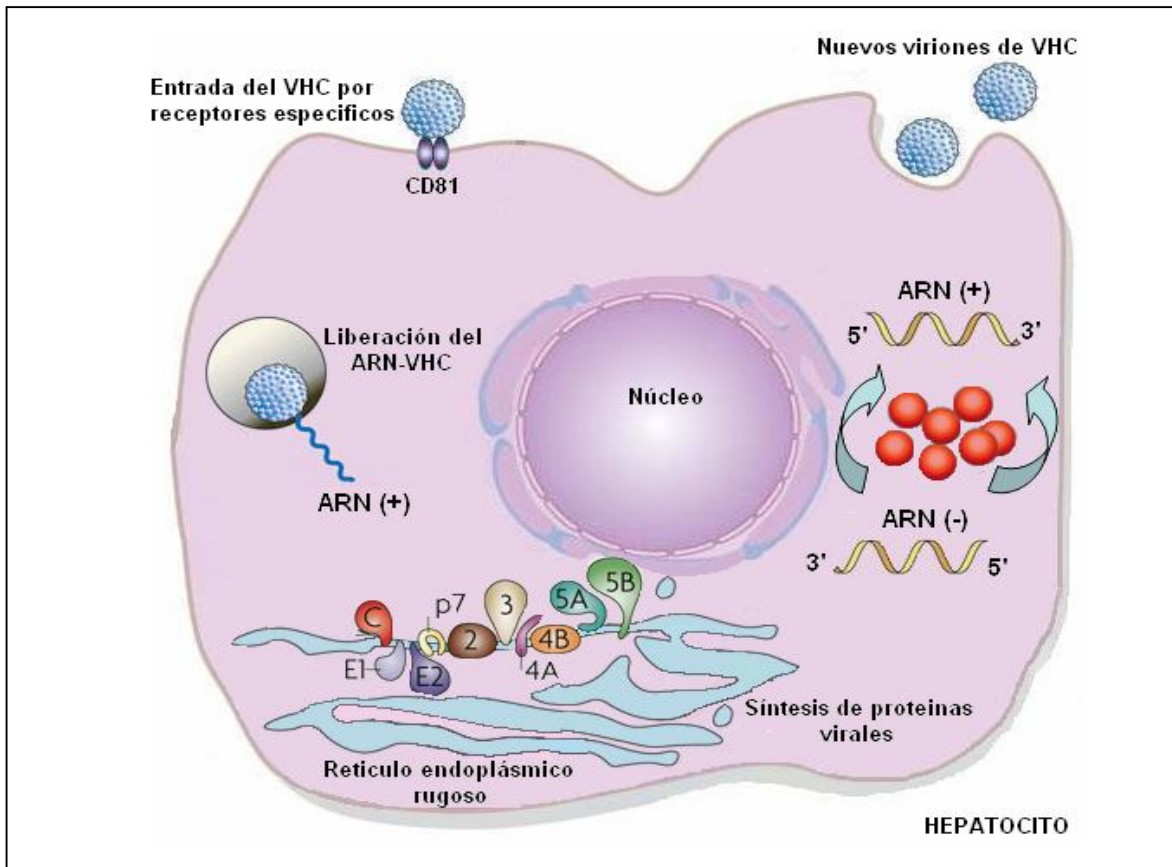


Figura 6. Ciclo replicativo del VHC. El virus C entra a la célula por un mecanismo de endocitosis mediada por receptores inespecíficos como el de la tetraspanina CD81, una vez en el interior, el ARN se libera y desdobra en el citoplasma, actúa como molde tanto para la síntesis de proteínas estructurales (core, E1, E2) y no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4 y NS5), así como para su replicación. ⁽¹⁷⁾

El ARN del VHC actúa como molde tanto para la traducción como para la transcripción del genoma, la traducción da origen a una sola lipoproteína inmadura, la cual sufre proteólisis para dar origen a las proteínas estructurales (S) y no estructurales (NS). La transcripción del genoma tiene lugar en el citoplasma y es factible por la actividad de la RdRp. Finalmente, el genoma y proteínas estructurales del virus se ensamblan para dar origen a la nueva progenie viral, los viriones salen de la célula por un mecanismo de exocitosis, sin dañar la membrana plasmática y listos para infectar nuevas células. ⁽¹⁶⁾

10. RESPUESTA INMUNE ANTE LA INFECCION DE HEPATITIS C

Ante la presencia del VHC en los hepatocitos, las primeras células en actuar son las células asesinas naturales (natural killer cells, NK) inducidas por los interferones α , β (INF- α y β) e interleucinas (IL-2). En respuesta a la inducción éstas células secretan interferón- α , factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor, TNF- α) y quimiocinas (macrophage inflammatory protein 1 alpha, MIP-1), proporcionando así la primera línea de defensa ante la infección viral en el tejido hepático.⁽¹⁸⁾ Las células NK y células T asesinas naturales (natural killer T cells, NKT) no tienen receptores antígeno específicos del VHC pero ejercen citólisis inespecífica sobre las células infectadas por el virus. Se ha propuesto que CD81, una glicoproteína de membrana de las células NK, NKT y de otros tipos celulares, actúan como receptor de la proteína E2 del VHC. Esta unión bloquea la actividad efectora de las células NK, disminuye su proliferación, la producción de citocinas y la liberación de gránulos citotóxicos ⁽¹⁹⁾. Se ha demostrado que las subpoblaciones de células NK CD56+, CD3 hepáticas y las NKT CD56CD3+ disminuyen en número, capacidad secretora de interferón- α y actividad citotóxica lo cual favorece la progresión del daño histológico por el VHC.⁽²⁰⁾

Se ha propuesto que el VHC no tiene un efecto citopático directo sobre las células que infecta, sino que el daño celular se debe a la respuesta inflamatoria del huésped ya que implica el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y citocinas proinflamatorias, así como una gran actividad de los linfocitos T citotóxicos (LT CD8+). Estos factores activan a las células estelares hepáticas las cuales secretan colágeno, inducen estrés oxidativo y provocan la muerte celular por necrosis dando lugar a la fibrosis.⁽²¹⁾ La respuesta inmune adaptativa ante el VHC está regulado por las células T CD4+ y es a través de sus funciones efectoras, al inicio de la infección producen citocinas Th1 (T helper cells, Th1), promueven el reclutamiento de neutrófilos, su activación y la respuesta inflamatoria.

Las citocinas Th2 como IL-4 e IL-10, regulan la producción de citocinas Th1. Se ha propuesto que el rompimiento del equilibrio en la regulación de la respuesta Th1/Th2 es uno de los mecanismos que podría condicionar la permanencia del virus y el daño hepático.⁽²²⁾ Hay evidencias de que la intensidad de la respuesta antiviral de células T CD4 (CT CD4+) durante la infección aguda determina la progresión de la infección.⁽²³⁾ Se ha propuesto que los individuos que llegan a depurar el VHC y normalizan los niveles de ALT tienen una enérgica respuesta proliferativa tipo CT CD4+, dirigida principalmente contra los antígenos virales E2, NS3, NS4 y NS5.⁽²³⁾ Mientras que la viremia persistente, está asociada a una débil respuesta proliferativa de CT CD4+ así como a la ausencia de respuesta de memoria CD4+ específicas al virus, facilitando el establecimiento del virus en el tejido hepático. También se ha propuesto que hay una relación inversa entre las citocinas Th1 y el número de copias del ARN-VHC, en donde a mayor nivel de citocinas Th1 (INF- α y TNF- α) hay menor producción de ARN-VHC. En general, se ha establecido que a una enérgica respuesta de células Th1 hay mayor probabilidad de eliminación del VHC. Mientras que la persistencia de este, se ha asociado a una diferenciación prematura de la respuesta tipo Th1 a Th2.⁽²⁰⁾ Por otra parte los LT, migran al tejido infectado, reconocen las células infectadas, vía moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y suprimen la replicación viral, vía citólisis. Se ha sugerido que el interferón- α y TNF- α secretados por estas células tienen un potente efecto antiviral en las células infectadas.⁽¹⁸⁾

Mecanismos de persistencia del VHC.

En relación a la respuesta inmune se han propuesto diversos mecanismos involucrados en la persistencia de la infección por el VHC y el daño celular hepático entre los que cabe destacar:

- 1.- La disminución de la actividad de las células NK, LT citotóxicos, células dendríticas (dendritic cells, DCs) y disminución de la secreción del interferón por las células NK, así como franca resistencia a los efectos del interferón a pesar de que es un potente inhibidor de la replicación viral.⁽²²⁾

2.- El VHC se aloja en células extrahepáticas como las DCs y se ha propuesto que inhibe y/o disminuye la actividad endocítica, así como la capacidad coestimuladora de estas células. ⁽²³⁾

3.- El desarrollo de anticuerpos específicos a algunos antígenos del VHC como son: las proteínas core, E1, E2 y NS5B no confieren un efecto neutralizante a las partículas virales, ni inmunidad al huésped que favorezca la resolución de la infección.

4.- La posibilidad de que el VHC se pueda establecer y replicar en tejidos extrahepáticos como son: el bazo, órganos linfoides, riñón y páncreas, le permite evadir a las células del sistema inmune y permanecer latente por largos periodos de tiempo en el organismo huésped. ⁽²⁴⁾

5.- La rápida diferenciación de la respuesta celular Th1 a Th2 durante la fase aguda.

6.- La elevada frecuencia de mutaciones en el genoma del VHC durante la replicación viral da origen a diferentes genotipos, subtipos y cuasiespecies que el sistema inmune no reconoce.

11. TRATAMIENTO

Actualmente el tratamiento combinado de Interferón pegilado (PEG-INF) y ribavirina se considera el método estándar de tratamiento para la infección crónica por virus C. El objetivo del tratamiento de la hepatitis crónica por virus C es la erradicación del VHC y con ello disminuir el riesgo de desarrollar daño hepático severo. Se ha definido como respuesta viral sostenida (RVS) al tratamiento antiviral con PEG-INF y ribavirina, cuando transcurridos 6 meses de haber concluido el esquema de tratamiento, la actividad replicativa del virus no es detectable, es decir, se negativiza el ARN-VHC y se alcanzan valores normales de las transaminasas hepáticas. ⁽²⁵⁾ La obtención de la respuesta al tratamiento se ha relacionado con la disminución en el riesgo de desarrollo de cirrosis hepática y de complicaciones hepáticas severas asociadas como el desarrollo de hepatocarcinoma e inclusive la muerte por falla hepática.

Sin embargo, en ésta población se ha observado que hay baja tasa de respuesta al tratamiento, así como la manifestación de efectos secundarios del tratamiento de intensidad variable. Por lo cual se han establecido criterios de selección para el manejo terapéutico.⁽²⁶⁾

11.1 Criterios para el manejo terapéutico de hepatitis crónica por el VHC

Los criterios a considerar para indicar el tratamiento son: ⁽²⁶⁾

- Presencia de ARN-VHC
- Detección del genotipo.
- Biopsia hepática con presencia de fibrosis
- Elevación persistente de ALT en más de 2 veces su valor normal en los últimos 6 meses
- Enfermedad hepática compensada
- Número de copias del ARN-VHC en suero (< 800.000 UI/mL
- Niveles normales de hemoglobina (> 14 g/dl), plaquetas ≥ 100.000).
- Ausencia de daño hepático debido a otra causa del VHC.
- Ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas.
- Ausencia de enfermedad autoinmune.

Algunos de ellos como el genotipo, bajo grado de fibrosis, así como bajo número de copias de ARN (< 800.000 UI) y función hepática compensada tienen valor pronóstico de respuesta al tratamiento. ⁽²⁷⁾

11.2 Interferón

En condiciones fisiológicas, los interferones son una familia de citocinas que el organismo produce como mecanismo de defensa innato de primera línea frente a la infección por virus. En el ser humano se producen tres tipos de interferón: Tipo I (α/β) y Tipo II (γ) con estructura y funciones similares.⁽²⁷⁾

El interferón- α endógeno es producido por las células fibroblastos y leucocitos como consecuencia de la infección viral o exógeno administrado terapéuticamente, es un antiviral potente. Existen diversos tipos de interferón sintético, tanto recombinantes (interferón α -2a, α -2b) como naturales (linfoblastoide). Recientemente se ha desarrollado una nueva formulación de interferón que se caracteriza por estar unida a una o dos moléculas de polietilenglicol (PEG). El compuesto resultante es muy estable y tras su administración por vía subcutánea, produce una liberación rápida del interferón, pero su eliminación es lenta aumentando así la vida media del compuesto, de manera que la acción del interferón se mantiene de forma ininterrumpida durante un período de tiempo mucho más largo, con un efecto terapéutico sostenido con la administración de una sola inyección por semana.⁽²⁸⁾ El PEG-INF α -2b tiene una cadena ligera de 12 KDa con una conformación lineal, mientras que el PEG-INF α -2a tiene una cadena ramificada de PEG de más de 40 KDa.

Propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas del PEG-INF

Mecanismo de acción del interferón.

Al administrar el interferón por vía sistémica el principio activo llega a la circulación y, por este medio, es transferido al sitio de infección para desencadenar una respuesta biológica. El interferón potencia la acción de las células NK, que son linfocitos citotóxicos que actúan de modo inespecífico sobre las células infectadas por virus.⁽³⁹⁾ Por una parte, estimula la aparición en la membrana celular de antígenos del sistema de histocompatibilidad clase I (HLA I), necesarios para que los linfocitos T citotóxicos ejerzan su acción lítica sobre los hepatocitos en cuyo interior se está replicando el virus.

El interferón también induce la activación de la 2'5' oligoadenilato-sintetasa, una enzima con efecto antiviral y pone en marcha el mecanismo celular que destruye el ARN viral.⁽³⁹⁾ La acción antiviral se potencia mediante el efecto inmunomodulador.

Absorción

El efecto de un fármaco en el organismo va a depender de tres procesos farmacocinéticos: la absorción, la distribución y la eliminación.⁽²⁹⁾

La absorción de un fármaco es el paso desde el sitio de administración a la circulación sistémica. En el caso de los interferones, la vía de administración indicada es la subcutánea.⁽³⁰⁾ En el sitio de inyección se forma un depósito de fármaco, a partir del cual las moléculas se difunden hasta alcanzar los vasos sanguíneos y entran a la circulación. Existen dos circunstancias que eventualmente pueden limitar la absorción. Por un lado, la difusión a través del líquido extracelular es más lenta para moléculas grandes que para moléculas pequeñas.⁽³¹⁾ De esta manera, el PEG-INF α -2b difunde más rápido que el PEG-INF α -2a. Por otro lado, las membranas de los vasos sanguíneos presentan una barrera para la difusión de sustancias. Las propiedades fisicoquímicas de los interferones pegilados limitan su difusión a través de estas membranas, por lo que deben hacerlo a través de poros.⁽³²⁾ El paso a través de los poros también depende del peso y de la forma de la molécula.⁽³³⁾ En el caso del PEG-INF α -2b, que tiene una cadena ligera de 12 KDa con una conformación lineal, el paso a través de los poros es más eficiente. En cambio, el PEG-INF α -2a el cual tiene una cadena de PEG de más de 40 KDa esta ramificada. Por tanto, la probabilidad de paso a través de los poros es menor que para el PEG-INF α -2b. En consecuencia, la aparición del PEG-INF α -2a en sangre periférica tomará considerablemente más tiempo y sólo el 60% de las moléculas administradas llegan a circulación sistémica.⁽³⁴⁾ La vida media de absorción, es decir, el tiempo que se requiere para que se absorban la mitad de las moléculas, es de 4.6 horas para el PEG-INF α -2b.⁽³⁵⁾ Mientras que para el PEG-INF α -2a es de 50 horas.

Es evidente que la cadena ramificada de PEG de 40 KDa disminuye de manera muy importante la velocidad de absorción, lo que no sucede con la cadena lineal de 12 KDa. La velocidad de absorción de los interferones pegilados depende de su capacidad para difundirse en el líquido extracelular desde el sitio de administración, así como de su paso a través de los poros vasculares para llegar a la circulación sistémica.

Distribución

A partir de los datos de la concentración sanguínea de un fármaco se puede conocer, de manera limitada pero útil, la distribución de un fármaco en los tejidos. ⁽³⁶⁾ En farmacocinética, se divide al organismo en compartimientos y por lo general, se asume que hay dos: uno central constituido por la circulación y tejidos ricamente vascularizados y otro periférico, constituido por tejidos poco vascularizados, músculo y tejido adiposo. En este sentido, el hígado es un órgano muy vascularizado, forma parte del compartimiento central. ⁽³⁷⁾ Dado que el hígado es el sitio de acción de los interferones en el tratamiento de la hepatitis C y que el fármaco se concentra en este órgano, se considera entonces que es compartimiento central al mismo tiempo el compartimiento efector del PEG-INF.

Un parámetro útil para estimar la extensión de la distribución del fármaco en el organismo es el volumen de distribución (Vd), el cual indica la relación entre la dosis administrada y la concentración en sangre. Si se administra una determinada dosis y la concentración sanguínea es alta, quiere decir entonces que el Vd es reducido y se concluye que sólo una pequeña proporción del fármaco pasa a los tejidos periféricos y es independiente del peso corporal. Por otro lado, si el Vd es grande la concentración en sangre es pequeña, como resultado de una importante distribución a los tejidos periféricos y depende del peso del individuo. Cuando el valor del Vd es reducido, se asume que la mayoría de las moléculas del fármaco permanece en el compartimiento central. ⁽²⁹⁾ La capacidad del compartimiento central está determinada por el volumen de sangre y la capacidad de los órganos ricamente vascularizados.

En el caso del PEG-INF, los mismos factores que limitan su velocidad de absorción limitan su distribución. El PEG-INF α -2b, es una molécula lineal, se difunde fácilmente en los líquidos corporales y pasa a través de los poros, por lo que sale extensamente de los vasos sanguíneos para distribuirse en el tejido periférico.

El Vd del PEG-INF es de 0.99 litros/kg, siendo similar al interferón no pegilado, que es de 1.4 litros/kg.⁽³⁵⁾ Por lo que, el Vd del PEG-INF α -2b, como el del interferón- α , depende del peso corporal. En cambio, para el PEG-INF α -2a, el cual tiene una cadena ramificada de 40 KDa de polietilenglicol, se difunde difícilmente a través de los poros, por lo que sale muy lentamente de los vasos. Por esta razón su Vd es reducido de 6 a 14 litros, cercano al volúmen de sangre, que es aproximadamente de 5 litros.⁽³⁸⁾

Así, que el PEG-INF α -2a se mantiene principalmente en el compartimiento central con ligeras variaciones en el Vd, pero se deben principalmente a variaciones en el volúmen de sangre y a la capacidad de los órganos ricamente vascularizados, y es independiente del peso corporal del paciente.⁽³⁸⁾

En cambio para el PEG-INF α -2b, una proporción de las moléculas absorbidas pasa al tejido periférico, siendo el Vd mayor y disminuye la concentración en el compartimiento central. Dado que el tamaño del compartimiento periférico depende del peso, es necesario ajustar la dosis de PEG-INF α -2b por el peso corporal para mantener concentraciones efectivas en el compartimiento central. En otras palabras, el ajuste de la dosis para el PEG-INF α -2b debe hacerse para compensar las pérdidas por transferencia al compartimiento periférico.

Eliminación

Existen dos procesos fundamentales para la eliminación de un fármaco: la excreción y el metabolismo. En el caso de los interferones, dada su naturaleza proteica, su eliminación es por metabolismo.⁽³⁵⁾ Como ya se ha mencionado, el interferón- α es rápidamente destruido por las proteasas, teniendo una vida media terminal corta.

La cadena lineal de PEG de 12 KDa del PEG-INF α -2b disminuye el número de zonas expuestas al ataque por proteasas, con lo que la probabilidad de lisis disminuye. La depuración es el parámetro que describe la eliminación del fármaco al porcentaje del mismo, eliminado del plasma por unidad de tiempo. La cadena lineal de 12 KDa del PEG-INF α -2b se reduce hasta en 10 veces la depuración con respecto al interferón - α , de 16.170 a 1.540 mL/h.

La vida media de eliminación depende tanto del Vd como de la depuración, ya que un fármaco que se distribuye ampliamente tiene una vida media más larga. La vida media terminal es de 37 horas para el PEG-INF α -2b mientras que para el interferón- α es de 7.2 horas. La cadena ramificada de 40 KDa del PEG-INF α -2a, protege de manera más eficaz que la cadena lineal de 12 KDa, dejando pocos sitios expuestos al ataque proteolítico, por lo que la depuración es muy baja, siendo de 80 mL/h, así la vida media en el organismo se prolonga hasta 80 horas.⁽³⁸⁾ La eliminación del interferón- α y los interferones pegilados se realiza exclusivamente a través de las proteasas. Por lo tanto, depende de la actividad de estas enzimas y no del peso corporal.

11.3 Ribavirina

La ribavirina es un nucleósido sintético análogo a la guanosina.^(40,41) La ribavirina entra en la célula hepática como un profármaco y es convertida en monofosfato, difosfato y trifosfato (RTP) de ribavirina, a través de una acción secuencial de diversas cinasas celulares.

Hasta este momento se han propuesto los siguientes mecanismos de acción:

- 1) Favorece la inmunidad del huésped frente al VHC potenciando una respuesta Th1 con aumento de citocinas como IFN- γ y TNF- α e IL-2, que aumenta la lisis de los hepatocitos infectados y reduce la producción de viriones.⁽⁴²⁾
- 2) Inhibición de IMPDH (inosina monofosfato deshidrogenada), un enzima que transitoriamente depleciona el pool intracelular de trifosfato de guanósina, que es esencial para la transcripción viral y la replicación de los virus ARN.
- 3) Actúa como un mutágeno del VHC al incorporarse dentro de los nuevos genomas sintetizados, dando lugar a mutaciones inducidas por la ribavirina en el genoma viral originando un “error catastrófico” de la replicación (mutaciones suicidas).⁽⁴²⁾

Absorción

La ribavirina es hidrosoluble, se absorbe por vía oral y alcanza su concentración plasmática máxima a los 90 minutos, por vía intravenosa a los 30 minutos y en ambos casos con niveles superiores a las concentraciones inhibitorias mínimas para los virus susceptibles. Su vida media inicial por vía oral es de 2 horas y por vía parenteral de 15 minutos. Su vida media terminal es de 40 horas.⁽⁴¹⁾

Distribución y Eliminación

La ribavirina se metaboliza principalmente en el hígado, dando lugar al 1,2,4, triazol 3 carboxamida (metabolito activo) y al ácido 1,2,4, triazol 3 carboxílico. El 53% de la dosis administrada se elimina por orina como ribavirina y sus metabolitos. También se excreta por heces (15%) y vía pulmonar (2%). Se distribuye ampliamente en hígado, glándulas salivales, glándulas suprarrenales, bazo, riñón y pasa al líquido cefalorraquídeo en concentraciones de 60-95% en relación con las concentraciones plasmáticas.⁽⁴³⁾

11.4 Posología del tratamiento combinado de PEG-INF α -2b y Ribavirina

La posología del PEG-INF α -2b en pacientes con VHC es de 100 μ g por vía subcutánea en pacientes cuyo peso corporal se encuentre menor o igual a 65 kg o 100-120 μ g para pacientes cuyo peso oscile entre 65 a 85 kg, una vez por semana y la dosis de ribavirina es de 1000 a 1.200 mg diarios por vía oral.⁽⁴⁴⁾

La duración del tratamiento es de 48 semanas en pacientes infectados con **VHC Genotipo 1** y de 24 semanas en pacientes con **VHC Genotipos distintos al 1**.⁽⁴⁴⁾

Efectos tóxicos del tratamiento combinado de PEG-INF y Ribavirina

1. Efectos adversos frecuentes y leves

- Pseudo-gripales: Fiebre, cefalea, artralgias, dolor muscular.
- Generales: Astenia, anorexia, caída del cabello, diarrea.
- Neuropsiquiátricos: Apatía, dificultad de concentración, irritabilidad.
- Laboratorio: Granulopenia, anemia, plaquetopenia y trombocitopenia

2.- Efectos adversos menos frecuentes

- Neuropsiquiátricos: Depresión mayor, psicosis, delirio, confusión, ataxia, convulsiones.
- Inmunológicos: Tiroiditis, exacerbación de enfermedades autoinmunes como: psoriasis, fibrosis intersticial pulmonar.

3.- Contraindicaciones

- Embarazo
- Lactancia
- Anemia hemolítica
- Insuficiencia renal
- Función hepática descompensada
- Enfermedad autoinmune

11.5 Respuesta al tratamiento

La respuesta al tratamiento combinado de PEG-INF y ribavirina se evalúa de acuerdo a la normalización de las transaminasas; como respuesta bioquímica, por desaparición del ARN viral, como respuesta virológica. Y los cambios favorables en la biopsia hepática, como, respuesta histológica. La respuesta al tratamiento en la mayoría de los pacientes no es absoluta y de acuerdo al número de copias del ARN-VHC durante el tratamiento.

A continuación se describen los diferentes grados de respuesta al tratamiento que son útiles en el seguimiento y toma de decisiones terapéuticas, en pacientes con infección crónica por virus C:⁽²⁸⁾

— **Respuesta Viral Sostenida (RVS):** no detección del ARN-VHC en la biopsia hepática al final del tratamiento.

—**Respuesta viral temprana (RVT):** se define como la disminución del número de copias del ARN-VHC igual o mayor a 2 logaritmos con respecto al valor basal en la semana 12 de tratamiento. Y se describe como una respuesta precoz de valor pronóstico de respuesta viral sostenida.

—**Respuesta viral transitoria:** Hay negativización del ARN viral y se mantiene mientras el paciente está en tratamiento, pero al suspenderlo el ARN vuelve a ser detectable, aproximadamente a las 12 semanas postratamiento.

—**Sin respuesta:** no se produce disminución del ARN-VHC ni de las transaminasas durante el tratamiento.

—**Recaída o recidiva:** hay una disminución inicial del ARN-VHC al inicio del tratamiento, pero no se mantiene a pesar de que el paciente continúe con el tratamiento.

12. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO

La resistencia de la célula blanco a múltiples fármacos se debe a un decremento en la acumulación intracelular de éstos, mediados por un incremento en el eflujo o extrusión de los mismos. La causa puede ser una menor permeabilidad celular al fármaco o bien que éste sea expulsado al exterior.⁽⁴⁵⁾ Algunos de los mecanismos de resistencia intracelular a los efectos citotóxicos y citostáticos del tratamiento farmacológico se clasifican de manera general en los siguientes grupos:⁽⁴⁶⁾

1. Disminución de la concentración intracelular del fármaco en el blanco molecular debido a:

Expulsión del fármaco a través de la membrana celular por la elevada actividad de las proteínas transportadoras de membrana.

Secuestro del fármaco y variaciones en el transporte del núcleo al citoplasma.

Inactivación metabólica del fármaco.

2. Alteraciones del blanco molecular

Modificación en la estructura molecular de los enzimas blanco por acción de las topoisomerasas.

3. Evasión de la muerte celular

Incremento en la capacidad de reparación del ADN

Falla en la muerte celular programada.

12.1 Proteínas de múltiple resistencia a drogas de unión a ATP (MRP'S / ABC)

Las proteínas MRP's son proteínas transmembranales, glicosiladas que actúan como "bombas de expulsión" de aniones orgánicos, lipofílicos y quimioterapéuticos neutros, que pueden estar conjugados o no con sustancias como el glutatión, glucoronato y sulfatos. Su amplia distribución en tejidos y la conjugación de sustratos con el glucoronato parece ser importante para la actividad de MRP-2 ya que actúa de manera generalizada como bomba de GSH. Por este mismo sistema, también podrían estar relacionadas con la expulsión de toxinas naturales, sales de metales pesados, como el arsénico, y con la resistencia a pequeñas moléculas, como el cisplatino.⁽⁴⁷⁾

Estas proteínas también son conocidas como proteínas ABC (the ATP-binding cassette, ABC), ya que se unen al ATP y lo usan como fuente de energía para el transporte de varias moléculas que cruzan todas las membranas celulares. Las proteínas se clasifican como transportadores ABC basado en la secuencia y organización de su dominio de unión al ATP. La subfamilia ABCC contiene 12 transportadores con diversos espectros funcionales que incluyen el transporte de iones, receptores de superficie de células y secreción de toxinas. (Anexo I)

Dentro de éstos transportadores se encuentra el regulador de conductancia transmembranal de fibrosis cística (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) ⁽⁴⁸⁾ y las proteínas ABCC8, ABCC9. El resto de la subfamilia está compuesta de nueve genes relacionados a la resistencia a múltiples fármacos (ABCC/MRP). Estos genes MRP-1, MRP-2, y MRP-3 transportan fármacos conjugados con glutathione y otros aniones orgánicos. Las proteínas MRP-4, MRP-5, MRP-11, y MRP-12, son más pequeñas que otros productos del gen MRP-1 y carecen del dominio N-terminal que no es esencial para su función de transporte. Las proteínas MRP-4 y MRP5 confieren resistencia a nucleósidos incluyendo análogos de purina. ⁽⁴⁸⁾

12.2 Gen MRP-2 /ABCC2

La proteína MRP-2 es un transportador de unión a ATP, juega una función importante en el proceso de detoxificación y quimioprotección de la célula, por el transporte de una gran variedad de compuestos, especialmente de conjugados de sustancias con glutathione, glucoronato y sulfato, como también es el responsable principal del transporte de bilirrubina hacia los canalículos biliares. Se localiza en el cromosoma 10q24 y se expresa principalmente en las células canaliculares del hígado. (Figura. 7). Se ha encontrado que este gen presenta mutaciones asociadas con el síndrome de Dubin-Johnson en el que existe una alteración en el transporte de iones orgánicos. ⁽⁴⁹⁾

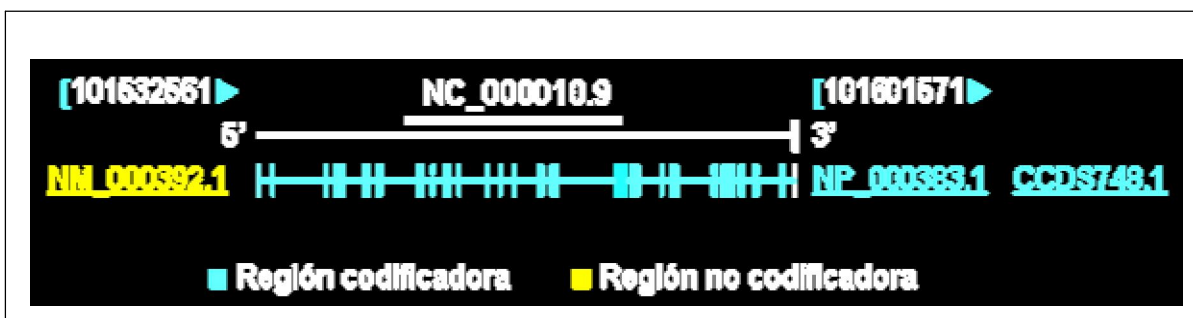


Figura 7. Estructura del gen MRP-2. La proteína MRP-2 contiene 32 exones.⁽⁵⁰⁾

12.3 Distribución en tejidos de MRP-2

La distribución de MRP-2 en los tejidos condiciona tanto la disposición como la toxicidad de drogas y toxinas ambientales. Además existen diferencias en la distribución de tejidos dependiendo del tipo de transportador. Estas variaciones son importantes para la evaluación farmacológica y toxicológica de drogas.⁽⁵¹⁾ La caracterización de la distribución del ARNm del MRP-2 en hígado y otros tejidos demuestra que esta proteína se expresa en la membrana apical del túbulo proximal del riñón, duodeno, yeyuno, células endoteliales del cerebro, posiblemente forma un componente funcional de la barrera hematoencefálica y placenta, donde la actividad de ésta proteína sirve como protección al feto de toxinas endógenas.⁽⁵¹⁾

12.4 Estructura y Actividad de MRP-2

Como todas las proteínas de transporte, MRP-2 esta compuesto de un largo segmento central que contiene dos dominios de unión a nucleótidos, del inglés nucleotide-binding domains (NBDs), tres dominios transmembranales, del inglés membrane-spanning domains, (MSDs) conectados por dos dominios poco conservados, del inglés poorly conserved linker regions, (L0 y L1) y dos dominios altamente conservados, del inglés conserved nucleotide-binding domains, (NBD1 y NBD2) (Figura. 8)⁽⁵¹⁾ Los dominios NBDs de las proteínas ABCC, funcionalmente no son equivalentes ya que NBD1 posee una alta afinidad de unión a ATP con respecto a NBD2 sin embargo, NBD2 tiene mayor capacidad para hidrolizar ATP que NBD1.

Esta proteína está constituida por 1545 aminoácidos con aproximadamente 200 aminoácidos en el dominio terminal MSD-0. Los dos bucles de unión a nucleótidos citosólicos están localizados en el segmento de unión entre MSD1, -2 y en la cadena terminal intracelular de MSD2 respectivamente. ⁽⁵²⁾

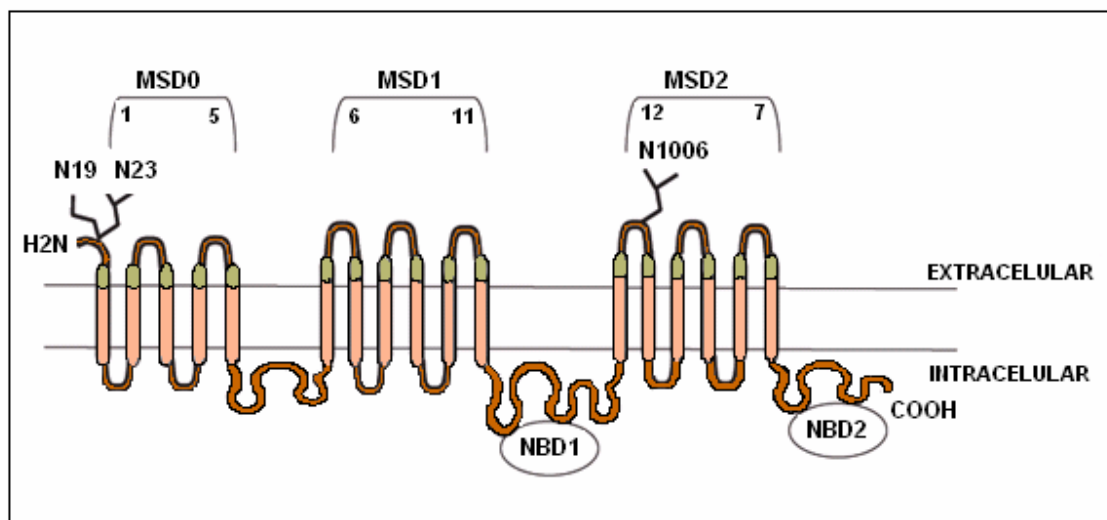


Figura 8. Modelo común de la topología de membrana de la familia MRP. MRP-2 está compuesto de un segmento central con dos dominios de unión a nucleótidos (NBDs) y tres dominios transmembranales (MSD0, -1, y -2), que a su vez están conectados por cuatro dominios (L0, L1, NBD1, NBD2). ⁽⁵²⁾

Se han realizados diversos estudios para inducir experimentalmente mutaciones y caracterizar los sitios de transporte de los sustratos de MRP-2, éstos estudios están basados en información con respecto a la importancia de los residuos de aminoácidos localizados en el dominio MSD0 relacionados a los transportadores de unión a ATP tal como MDR1 y MRP1. ⁽⁵²⁾ Las hélices transmembranales 6, 9, 16 y 17 de la proteína MRP-2 contienen residuos básicos probablemente involucrados en la interacción entre sustrato y proteína, formando dos sitios de unión a sustratos similares pero no idénticos (Figura. 9). Uno de estos sitios regula la afinidad por los sustratos y el otro parece estar directamente involucrado en el transporte. ⁽⁵²⁾

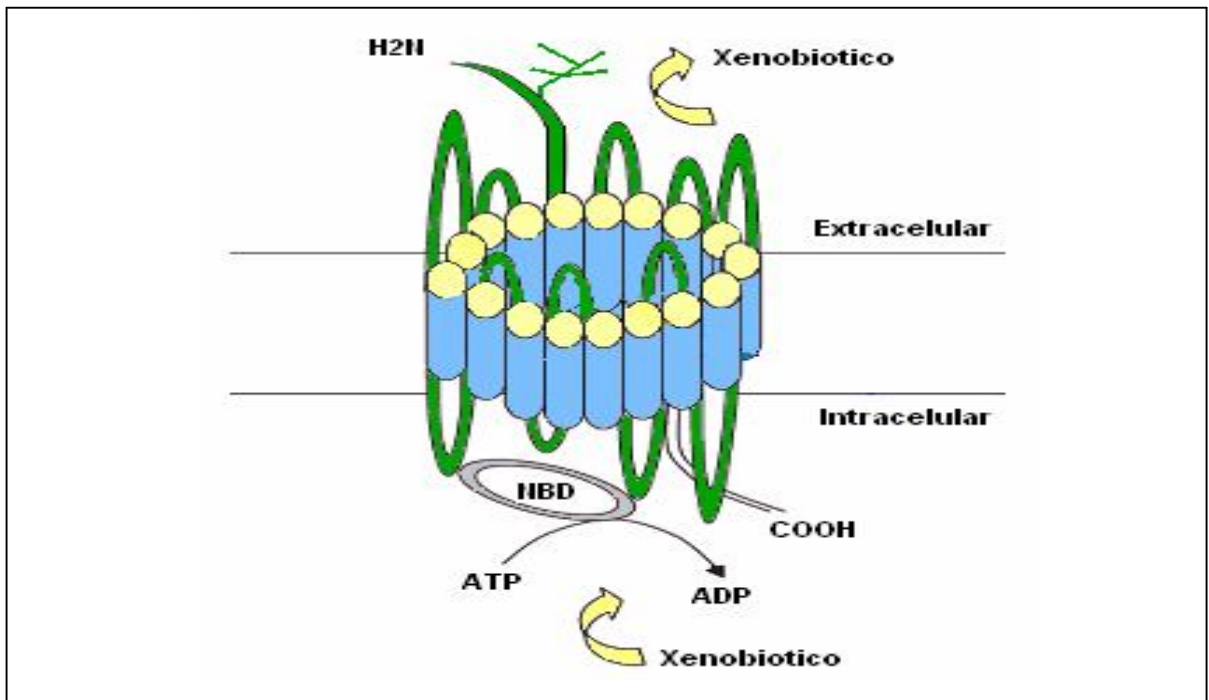


Figura 9. Vía de transporte de sustratos por MRP-2. MRP-2 transporta aniones anfifílicos, especialmente conjugados, como endógenos de glutatión, leucotrienos, glucoronidos y algunos productos de la Fase II de detoxificación de xenobioticos, por ejemplo, el glucoronido -O, NNAL (metilnitrosamina) un carcinógeno específico del tabaco.⁽⁵²⁾

Se ha sugerido que el reconocimiento de los ligandos se logra a través de las interacciones entre dos sitios hidrofóbicos y dos electrostáticamente positivos.

En algunos estudios se encontró que una mutagénesis puntual dirigida en la que se sustituye una lisina por una metionina en el dominio transmembranal 6 (K325M) y arginina a leucina en el dominio transmembranal 11 (R586L) reduce marcadamente el transporte de conjugados de glutatión, 2,4-dinitrofenil glutatión y leucotrieno C4 (LTC4), sin embargo, no afecta la capacidad de transporte de glucoronato y conjugados de sulfato. Además, un residuo altamente conservado en el segmento transmembranal (Trp 1254) ha demostrado ser esencial para el transporte de metotrexato (antineoplásico) mediado por MRP-2.⁽⁵²⁾

12.5 Sustratos de MRP-2

La proteína MRP-2 transporta una gran diversidad de xenobióticos y tiene la capacidad de expulsar compuestos como el glutatión, glucoronato y sulfato. El mejor sustrato de ésta proteína son los glucorónidos de bilirrubina. ⁽⁵²⁾ (Tabla 1).

Sustratos endógenos	Sustratos exógenos
Glutatión	Sustratos anticancerígenos metotrexato, cisplatino, camptotecinas.
Leucotrieno C4,D4,E4	Fármacos VIH Indinavire, ritonavir, nelfinavir.
Conjugados de sales biliares	Antibióticos ampicilina, irinotecan
Glucoronidos de bilirrubina	Diversos fármacos pravastatina, acetaminofen, fenobarbital.
Esteroides	Tóxicos S-glutationil-2,4-dinitrobenceno, ocratoxina A.

Tabla 1. Sustratos afines a MRP-2 ⁽⁵²⁾

12.6 MRP-2 y VHC

Durante el daño hepático los genes de respuesta de fase aguda, son rápidamente sobreexpresados para restaurar la homeostasis y limitar el daño en el tejido. Las enfermedades hepáticas se caracterizan por presentar alteraciones en el transporte hepatobiliar de compuestos endógenos y exógenos. La expresión de las proteínas de transporte generalmente disminuye y con ello el eflujo celular de diferentes compuestos endógenos y exógenos se ve afectado.

Condiciones como la inflamación crónica y/o aguda, así como la presencia de citocinas inflamatorias contribuyen afectando el transporte. El daño hepático debido a la infección crónica por VHC se debe a que éste causa estrés oxidativo, la producción de radicales libres de oxígeno, depleción de GSH, supresión de la proteína p53 y la liberación permanente o constante de citocinas inflamatorias también son consecuencia de la lesión del tejido hepático. Otros eventos asociados a este daño, es la desregulación de HNF-1 y HNF-4, NF- κ B, STAT-3, así como la disminución en la expresión de MRP-2. ⁽⁵³⁾

La expresión de MRP-2 en la membrana del canalículo biliar en el hepatocito desarrolla una función muy importante en la deposición y destoxificación de xenobióticos, por lo que se ha propuesto que este puede ser uno de los mecanismos de defensa del tejido hepático frente a toxinas, fármacos, secreción de sales biliares y solutos orgánicos, bajo ciertas circunstancias de daño hepático como son colestasis e hiperbilirrubinemia crónica y resección de tejido hepático. Sin embargo también se ha documentado que en situaciones de daño masivo como la cirrosis, la expresión y/o función de MRP-2 podría estar disminuida. ⁽⁵³⁾

13. Problema de investigación

La hepatitis C es una enfermedad que se encuentra dentro de las primeras causas de morbilidad y mortalidad hepática. En México el 1.4% de la población está infectada por éste virus.⁽²⁾ Se espera que en los próximos 10 a 20 años se triplique la muerte debido a esta enfermedad. El tratamiento actual es de elevado costo y no garantiza la erradicación del virus, además que los efectos colaterales del tratamiento afectan la calidad de vida del individuo

Actualmente se sabe que el 50% con infección crónica por VHC, no responden al tratamiento antiviral y en la mayoría de los casos son portadores de genotipo 1 del virus C.⁽⁵⁴⁾

Por otra parte, en diversos estudios realizados en pacientes con neoplasias se ha observado que uno de los factores que está involucrado en el mecanismo de resistencia al tratamiento es la sobreexpresión de MRP-2, proteína que tiene una función muy importante en la homeostasis hepática ante el daño por infección y detoxificación de xenobióticos.

Estudios *in vitro* con infección crónica por VHC han proporcionado evidencia de que las proteínas del virus C promueven la sobreexpresión de MRP-2, por lo tanto, esta proteína podría ser uno de los factores que determine la resistencia al tratamiento con PEG-INF y ribavirina en pacientes con hepatitis C crónica.⁽⁵²⁾

13.1 Justificación

En la actualidad se sabe que algunas proteínas de transporte como la MRP-2 ejercen un mecanismo de resistencia al tratamiento de enfermedades infecciosas y neoplásicas.⁽⁴⁴⁾ Sin embargo se desconoce si en la infección crónica por VHC ésta proteína participa como un mecanismo de resistencia al tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. En este proyecto se determinó si la expresión de MRP-2 estaba relacionada con la elevada tasa de resistencia al tratamiento antiviral en los pacientes con infección crónica por VHC, ya que un alto porcentaje de pacientes con VHC genotipo 1 no responden o presentan recaída al mismo, lo cual detiene el proceso de mejoría y disminuye progresivamente la calidad de vida del paciente.⁽²⁷⁾ También se determinó si el genotipo del virus de la hepatitis C determina una expresión diferencial de MRP-2, como se menciono anteriormente el genotipo del virus C es un factor pronóstico de respuesta al tratamiento antiviral, al conocer si MRP-2 modifica su expresión en relación al genotipo del VHC y respuesta al tratamiento, se podría proponer como un blanco terapéutico para un mejor manejo de la infección crónica por VHC.

13.2 Hipótesis

Los niveles de expresión de MRP-2 están asociados con la resistencia al tratamiento combinado con PEG-INF y ribavirina en pacientes con infección crónica con virus C.

Objetivo general

Determinar los niveles de expresión de MRP-2 en tejido hepático en pacientes con VHC antes y después del tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar el número de copias del ARN-VHC en tejido hepático de pacientes infectados por hepatitis C crónica, a fin de identificar los pacientes con respuesta viral sostenida.
- 2.- Determinar si existe asociación entre los niveles de expresión de MRP-2 y la respuesta al tratamiento con PEG-INF α -2b en pacientes con infección crónica por VHC.
- 3.- Determinar si existe asociación entre los niveles de expresión de MRP-2 con el genotipo del VHC antes y después del tratamiento con PEG-INF α -2b.

13.3 Metodología

Este estudio se hizo concatenado a un protocolo de tratamiento con Interferón Pegilado α -2b y Ribavirina a 100 pacientes con VHC “Tratamiento combinado, ponderado por peso, con PEG-interferón alfa-2b más Rivabirina en pacientes mexicanos con Hepatitis crónica sin tratamiento previo” aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. De los cuales para este proyecto se seleccionó de forma aleatoria una muestra de 30 pacientes obteniendo de cada uno, una biopsia por punción hepática en condiciones basales y a seis meses de concluir el tratamiento antiviral.

La participación de los pacientes fue con consentimiento informado y el protocolo sometido a evaluación por el comité de ética.

Criterios de Inclusión

Pacientes con Ac. contra VHC determinado por ELISA de 3^{era} generación.

Niveles de ALT elevados en más de 2 veces su valor normal, durante los últimos 6 meses.

Cuantificación del número de copias del ARN-VHC en sangre periférica, al inicio del tratamiento.

Identificación del genotipo del VHC.

Documentación del grado de fibrosis en biopsia hepática.

Función hepática compensada

Criterios de exclusión

Enfermedad autoinmune

Consumo de alcohol a dosis mayor o igual a 80g/día

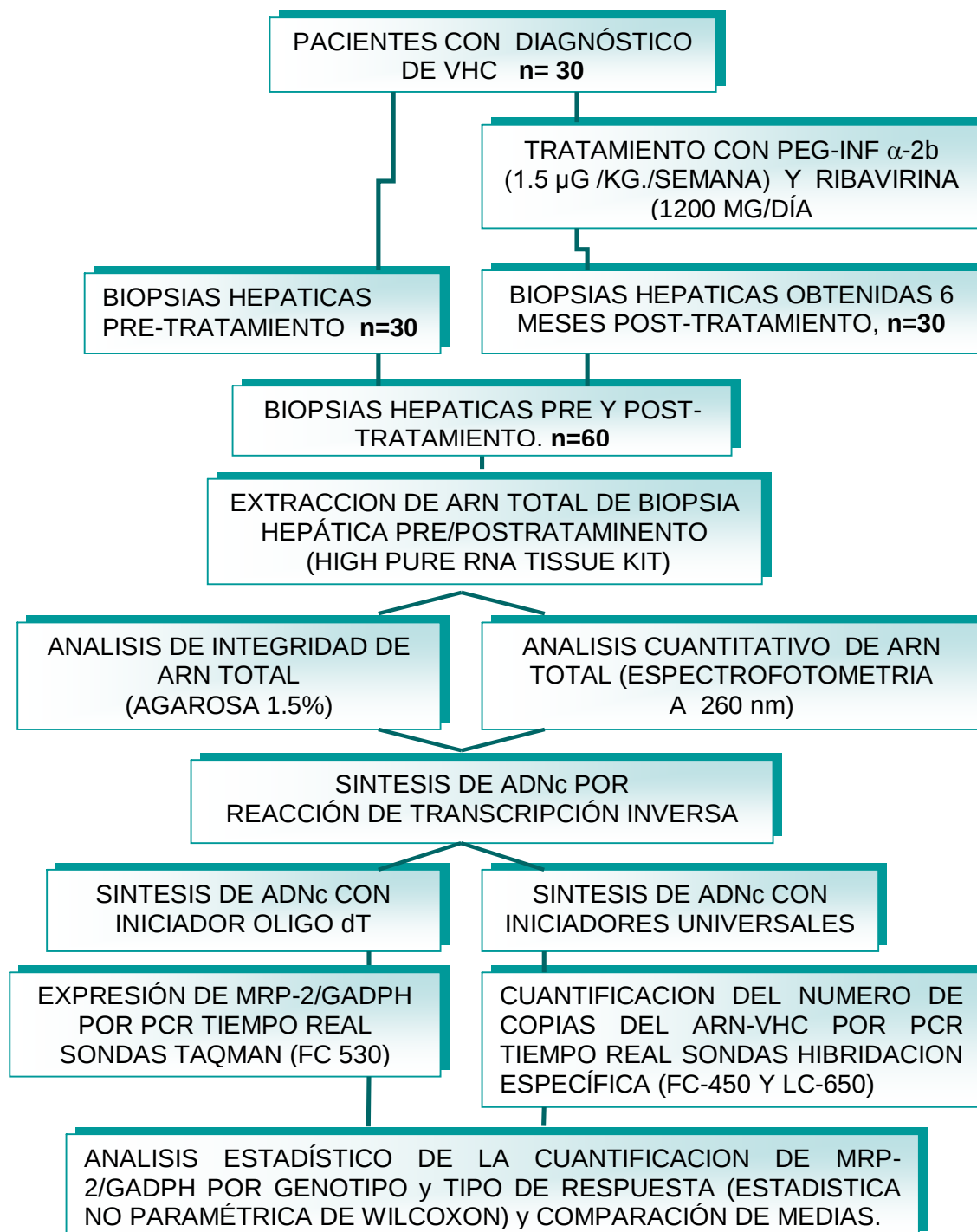
Valor basal de hemoglobina (Hb) menor a 12g/dL,

Cuenta de leucocitos <1500/mm³

Plaquetas <100,000/mm³

Alteraciones neuropsiquiátricas

13.4 Diagrama de Flujo (Estudio experimental)



13.5 ESQUEMA DE TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Los pacientes con infección crónica por VHC genotipo 1 recibieron PEG-INF α -2b a dosis de 1.5 μ g /kg /semana por vía subcutánea durante 48 semanas y los pacientes con infección crónica por VHC genotipo diferente a 1 recibieron PEG-INF por 1.5 μ g /kg /semana durante 24 semanas y ribavirina a dosis de 1200 mg/3 veces/semana vía oral. Se seleccionó en forma aleatoria una muestra de 30 pacientes, positivos al VHC por ELISA de 3^{era} generación (COBAS V3), se documentó genotipo y número de copias del ARN-VHC basal por PCR en tiempo real en suero. Se seleccionó la biopsia hepática percutánea de cada paciente obtenida antes y 24 semanas posteriores al tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina, las biopsias de tejido hepático se almacenaron a -70° C en RNA-Later® (Ambion) hasta su análisis. Se realizó extracción del ARN total de las biopsias de tejido hepático con reactivos del estuche de extracción para tejido hepático (High Pure RNA tissue, Roche®), se cuantificó el ARN total por espectrofotometría (absorbancia 240, 260 y 280 nm) para determinar el contenido de ARN total y proteínas. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para observar la integridad del ARN total obtenido. Posteriormente, se sintetizó ADNc por reacción de transcripción reversa en PCR convencional (termociclador Perkin Elmer 9600®) y se amplificó la secuencia del gen blanco (MRP-2) y del gen constitutivo (GADPH) con sondas Taqman por PCR en tiempo real. Finalmente, para determinar el número de copias del ARN-VHC se sintetizó ADNc empleando iniciadores aleatorios universales y sondas de hibridación secuencia específica a la región blanco, la amplificación se realizó por PCR en tiempo real.

13.7 Reactivos

1. Reactivos para extracción de ARN total de tejido (High Pure RNA Tissue kit).

- Solución de Guanidina-HCL, la cual contiene solución amortiguadora de fosfato de sodio para lisis y unión, 4.5 M, 100mM de pH=6.6.
- Solución de DNAsas con actividad enzimática de 10 U/ μ L.
- Solución amortiguadora de incubación de DNAsas, 1 M NaCL, 20 mM Tris-HCK, 10mM MnCL₂ pH= 7.0)
- Solución amortiguadora de lavado I, 5 M Guanidina-HCL, 20 mM Tris-HCL pH=6.6.
- Solución amortiguadora de lavado II, 20mM Guanidina-HCL, 2 mM Tris-HCL pH=7.5.
- Solución amortiguadora de elusión del ARN total.

2. Reactivos para síntesis de ADNc por reacción de reverso transcripción.

- Iniciador de transcripción, oligonucleotido de deoxitimina (Oligo (dT) iniciador, 50 μ M
- Solución amortiguadora, [5x], 250 Mm Tris/HCL, 150 mM KCL, 40 mM MgCl₂, pH aprox. 8.5 (25° C)
- Inhibidor de ARNasas, 40 U/ μ l, 20 Mm Hepes-KOH, 50 mM KCL, 8 mM ditiotritol, 50% glicerol (v/v), pH aprox. 7.6 (4° C)
- Mezcla de desoxirribonucleótidos, 10 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Enzima transcriptasa reversa, 20 U/ μ L
200 mM fosfato de potasio, 2 mM ditiotritol, 0.2% Triton X-100 (v/v), 50% glicerol (v/v), pH aprox. 7.2.

3. Reactivos para la electroforesis en gel de agarosa

- Solución amortiguadora de Tris Borato EdTA (TBE, [1x])
- Agarosa grado analítico (Promega)
- Bromuro de etidio, 10 mg/dl
- Solución de arrastre de muestra (azul de bromofenol-xilecianol y glicerol al 40%)

4. Reactivos para cuantificación relativa de MRP-2/GADPH por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- Mezcla de reacción que contiene, 5X Taq ADN polimerasa, reacción amortiguadora, $MgCl_2$ y mezcla de desoxirribonucleótidos, con dUTP
- Iniciadores para MRP-2, 1.0 μM
- Iniciadores para GADPH, 1.0 μM
- Sonda de librería del genoma humano, TaqMan MRP2 No.1 y GADPH No.60, 1.0 μM .
- Agua estéril

5. Reactivos para cuantificación relativa de ARN-VHC en biopsia hepática por PCR tiempo real.

- Mezcla de reacción, 1X
- $MgCl_2$, 2 mM
- Iniciadores KY78'S y KY80'S, 0.5 mM
- Uracil-ADN glucosilasa, 1 μM
- Sondas de hibridación específica FL-450 Y LC-650, 0.3 mM
- Agua estéril

13.8 Equipo y material de laboratorio

1. Cámara de electroforesis horizontal para gel (Life Technologies®)
2. Capilares para PCR tiempo real compatible con termociclador modelo LightCycler 20 µl marca Roche®.
3. Carrusel para capilares 20 µl compatible con termociclador modelo LightCycler marca Roche®.
4. Celdas de cuarzo para espectrofotómetro.
5. Centrífuga Refrigerada modelo Mikro 22 R marca Hettich®.
6. Computadora portátil Inspiron 600m marca DELL®
7. Espectrofotómetro UV/VIS modelo Lambda E2201 marca Perkin Elmer®
8. Fuente de Poder modelo 3000 marca Bio-Rad®.
9. Guantes de látex
10. Homogeneizador tipo vórtex modelo Maxi- Mix II.
11. Hornos Microondas marca Samsung®.
12. Micropipetas automáticas tipo Pipetman modelo P10, P20, P200 y P1000 marca Wilson®.
13. Homogeneizador de biopsias de tejido modelo PT 1300D, marca Kinematica®
14. Ultracongelador de -70°C modelo No. B3-0318, marca Frilatic®.
15. Refrigerador 4°C /Congelador -20°C modelo No.B-B-02661 marca América®.
16. Termociclador para PCR convencional modelo 9600, marca Perkin Elmer®
17. Termociclador en tiempo real modelo LightCycler 2.0, marca Roche®.
18. Tubos para PCR de 0,2 ml de pared delgada, estériles.
19. Tubos cónicos de polipropileno estériles capacidad 0.6 y 1,5 ml.
20. Tubos con filtro (High Pure Filter Tubes) y tubos de recolección (Collection Tubes)

13.9 Métodos

I. Extracción de ARN total de tejido hepático con hepatitis C crónica (High Pure RNA tissue Estuche- Roche)

Se siguieron las instrucciones del fabricante con el estuche de extracción de ARN total de tejido. Se colocan 10 mg de muestra de tejido hepático en un tubo eppendorf esteril y se retira el excedente de RNA Later® y se coloca en un tubo cónico de polipropileno esteril, se agregan 300µL de solución amortiguadora de fosfato de sodio y con el homogeneizador se tritura el tejido hasta homogenizar completamente, se centrifuga a una velocidad de 14000 por 2 minutos para eliminar los residuos sólidos. El sobrenadante (lisado de ARN) se coloca en un tubo cónico de polipropileno esteril nuevo al cual se le agregó 0.5 vol. de etanol (aprox. 400 µL lisado+ 200 µl etanol) y se mezcla en vórtex por 30 segundos. Enseguida, se transfiere la mezcla a la columna con filtro previamente ensamblado en el tubo de recolección y se centrifuga a 13000 rpm. Se añaden 100 µL de una solución de DNAsas a la columna (actividad de 0.5 U/Lt) y se deja actuar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Al término de este tiempo se centrifuga y lava la membrana con 500 µL de solución amortiguadora I a 8000 rpm, después se realiza un segundo lavado con 300µL de solución amortiguadora II y se centrifuga a 13000 rpm. Se desecha el tubo de recolección y se coloca un tubo cónico de polipropileno esteril nuevo y para eluir el ARN total se adicionan 50 µL de solución amortiguadora de elución y se centrifuga a 8000 rpm. Se comprueba la integridad del ARN extraído en un gel de agarosa al 1.5% y se procede a realizar la síntesis de ADNc por la reacción de transcripción inversa.

II. Electroforesis en Gel de Agarosa

Se prepara un gel de agarosa al 1.5 %, se disuelve la agarosa con una solución amortiguadora de TBE 1x suficiente para el volumen final requerido, la mezcla se calienta a disolución, se deja enfriar a 45° C, se le agrega 2 µL de bromuro de etidio (10mg/dL), mezclando suavemente y se vierte a la cámara de electroforesis, se coloca el peine adecuado. Posteriormente se deja solidificar a temperatura ambiente, una vez solidificado se retira el peine y se le agrega la solución amortiguadora TBE 1x hasta cubrir el gel. Se procede a cargar cada una de las muestras, las cuales se prepararon previamente con 5 µL ARN y 3 µL de solución de arrastre (azul de bromofenol-xilencianol y glicerol 40%). Se coloca un marcador de peso molecular de 100 pb (Amplio Bio) que permite identificar los fragmentos amplificados. La electroforesis se realiza a 90 V durante 1 hora. Al término de este tiempo se desconecta la fuente y se retira el gel de la cámara, se observa y fotografía bajo luz UV.

III. Síntesis de ADN Complementario por Reacción de Transcripción Reversa

A partir del ARN total se realiza una reacción de transcripción inversa en un volumen de reacción de 20 µL, de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción:

2 µL de oligo dT, 4.0 µL de solución amortiguadora, 0.5 µL de inhibidor de ARNasas, 3 µL dNTPS, 0.5 µL de enzima transcriptasa inversa, con actividad de 10U/µL y 10 µL de ARN total extraído.

Se mezclan todos los reactivos y la reacción de transcripción inversa se lleva a cabo a un ciclo de desnaturalización a 90° C durante 7 minutos, un ciclo de síntesis a 55° C durante 60 minutos y un ciclo de enfriamiento a 4° C por tiempo indefinido. La reacción se realiza en un termociclador Perkin Elmer 9600. Se verifica la síntesis de ADNc en un gel de agarosa al 1.5%, de la misma manera que se mencionó anteriormente.

IV. Cuantificación de MRP-2/GADPH por PCR en tiempo real y sondas taqman

Para la amplificación de la secuencia blanco del gen MRP-2 se utiliza el cDNA obtenido por la reacción de transcripción inversa, se emplearon los siguientes iniciadores: MRP-2 sentido 5'-TCTAGCCGCTCTGTGGAAAC-3' y MRP-2 antisentido 5'-GCATGCTTCCCATGATGA-3', y la sonda No.1 (Librería universal de sondas, No.1 MRP2); el amplicón obtenido es de 62pb (Figura 14, anexo 1). La cuantificación de MRP-2 se realiza en base a la expresión del gen constitutivo GADPH, se emplearon los siguientes iniciadores: GADPH sentido 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3' y antisentido 5'-AGCCACATCGCTGAGACA-3' y la sonda No.60 (Librería universal de sondas, No.60 GADPH). El amplicón obtenido es de 66 pb. La mezcla de reacción para la amplificación de cada uno de los dos genes fue la siguiente: volúmen total de reacción de 10 μ L con los siguientes reactivos: 5 μ L de ADNc, 2.4 μ L de agua, 2 μ L de master, 0.1 μ L de sonda, 0.2 μ L de cada iniciador y 0.1 μ L de Uracil-ADN glucosilasa. Para cuestiones prácticas de pipeteo de reactivos se preparó una mezcla de reacción para un mínimo de 10 muestras por ensayo. La reacción de amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: Un ciclo con enzima uracilo glucosilasa para eliminar el ARN remanente a 40° 30 segundos, un ciclo de desnaturalización a 95° 10 minutos, 45 ciclos de PCR que incluye desnaturalización a 95° 10 segundos, alineación 60° 30 segundos, extensión 72° 1 segundo, por último un ciclo de enfriamiento a 40° 30 segundos, en el termociclador. El producto de PCR se analiza por medio del software del equipo de PCR- tiempo real Light Cycler 2.0 Roche® y el producto amplificado o amplicon se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

V. Cuantificación de ARN-VHC en biopsia hepática por PCR tiempo real

Para la cuantificación del ARN-VHC en el tejido hepático se emplea 5 µL del ADNc obtenido con iniciadores universales aleatorios. La secuencia blanco localizada en la región 5'UTR (13-339, 326 pb) se amplificó por PCR-Tiempo Real, se emplearon los siguientes iniciadores: KY78S sentido 5'-CAAGCACCTATCAGGCAGT-3' y KY80S antisentido 5'-AGCGTCTAGCCATGGCGT-3', y sondas de hibridación secuencia específica LC-640 sentido 5'-CCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTG-3 y FL-540 sentido 5'-GCAGCCTCCAGGACCCCCC-3 (Librería universal de sondas). Se construyó una curva estándar externa con un plásmido del genotipo 1b del VHC en un rango de concentración de 50 a 10^6 copias/reacción para cuantificar la cantidad de genoma VHC presente en cada una de las muestras. El volumen final de la reacción fue de 20 µL y la mezcla de reacción fue con los siguientes reactivos: 3.7 µL de agua estéril, 2.0 µL mezcla de reacción, 1.6 µL de MgCl, 1.0 µL de KY78S, 1.0 µL de KY80S, 10 µL de ARN-VHC, 0.2 µL de uracilo-DNA glucosilasa y 0.25 µL sondas de hibridación específica FC-450 y LC-650. Se calculó una reacción total para un mínimo de 10 muestras por ensayo.

15. RESULTADOS

a.-Pacientes

Se seleccionaron 30 pacientes con infección crónica por VHC que estaban bajo tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. La edad promedio fue de 51 años, 11 hombres y 19 mujeres. La mayoría de estos pacientes portadores de genotipo 1: 21 pacientes y solo 9 pacientes portadores de genotipo diferente a 1(2, 3 y 5). (Tabla 2)

Variable	n (%)
Edad promedio	51
Hombres	11 (36.6)
Mujeres	19 (63.3)
Genotipo 1	21 (70)
Genotipos 2, 3 y 5	9 (30)
Respuesta viral sostenida	11 (36.6)
No respuesta viral sostenida	19 (63.3)
Total de pacientes	30 (100)

Tabla 2. Población de estudio. Características basales de los pacientes incluidos en este proyecto.

b) Cuantificación de ARN total por espectrofotometría

Para conocer la concentración del ARN total obtenido se preparó una dilución 1:250 por duplicado con agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) y se midió en una longitud de onda de 260 nm y 240 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer E2201®) con lámpara UV.

$$\text{Concentración de ARN total } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{Absorbancia a 260 nm}) (\text{Dilución}) (40)/1000$$

Considerando que una unidad de D.O equivale a 260 nm (1D.O_{260})= 40 μg de ARN. La relación de absorbancia a 260/240 indica la pureza del ARN, se considera que las relaciones cercanas a 2.0 unidades de D.O_{260} son las óptimas.

Electroforesis en gel de agarosa

Para verificar la integridad de ARN total obtenido se realizó en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las muestras de ARN obtenidas del tejido hepático con VHC, las cuales se compararon con un marcador de peso molecular 100 pb. (Figura 10).

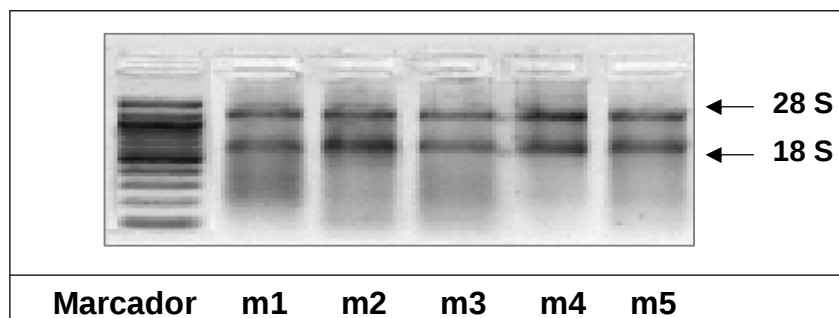


Figura 10. ARN total de tejido hepático en gel de agarosa al 1.5 %. En esta imagen se observan las bandas correspondientes a los ARN 18S y 28S, se observa una adecuada integridad de las muestras (m1-m5). El ARN total de cada biopsia tuvo un rendimiento promedio de 200-800ng y la calidad por densidad óptica fue de 1.5 –a 1.7.

c) Cuantificación de ARN- VHC

Se realizó la cuantificación del ARN-VHC en cada una de las 60 biopsias hepáticas a fin de determinar en el tejido hepático los cambios en el número de copias del ARN-VHC en respuesta al tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. (Figura. 11 y 12)

El número de copias del ARN-VHC de la primera biopsia (basal) se tomó como referencia y el número de copias del ARN-VHC de la segunda biopsia obtenida a los 6 meses de concluir el tratamiento (postratamiento), permitió determinar los cambios en del ARN-VHC. En base a estos cambios, en nuestro estudio se definió como **Respuesta viral sostenida (RVS)** a la no detección del ARN-VHC en la segunda biopsia hepática. Y **No respuesta viral sostenida (NO RVS)** a la detección de ARN-VHC en la segunda biopsia hepática, tomando como punto de corte 50 copias/reacción por nuestro método.

II. Resultados de la construcción de la curva de Plásmido

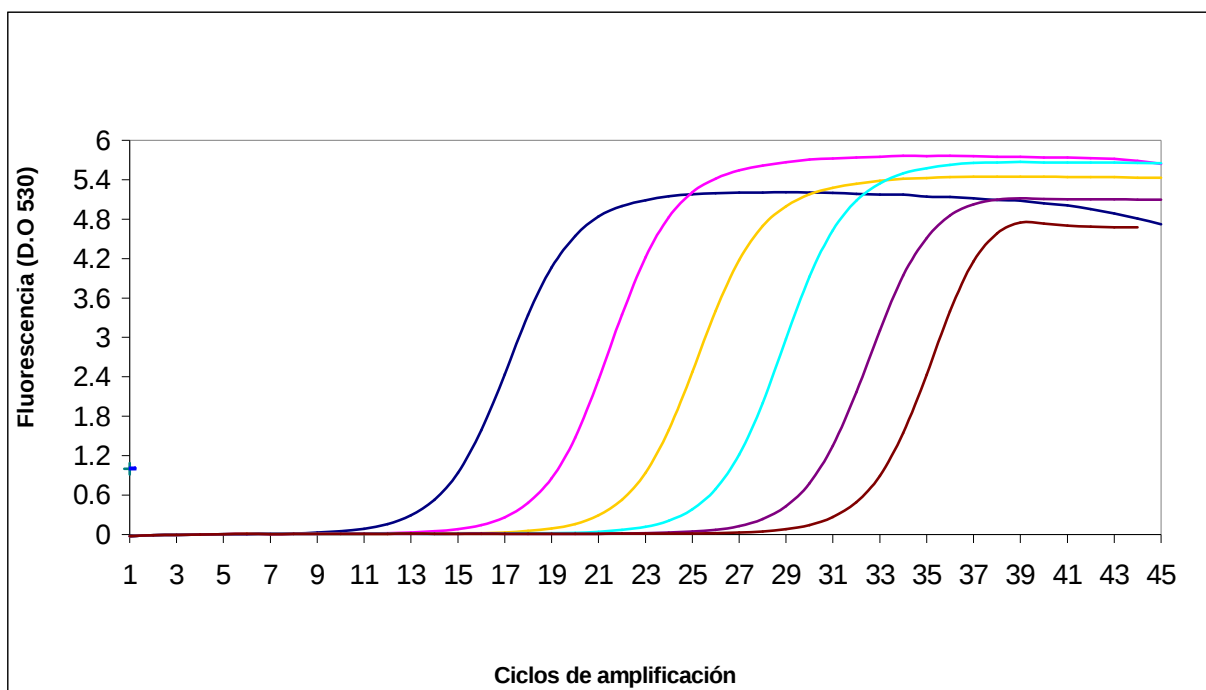


Figura 11. Curva estándar para la cuantificación de ARN-VHC. Construida con un plásmido de VHC-1b.con rango de concentraciones de $50\text{-}10^6$ copias/reacción. Punto de corte 50 copias/reacción por PCR tiempo real. La amplificación se registro en el rango de 17-37 ciclos.

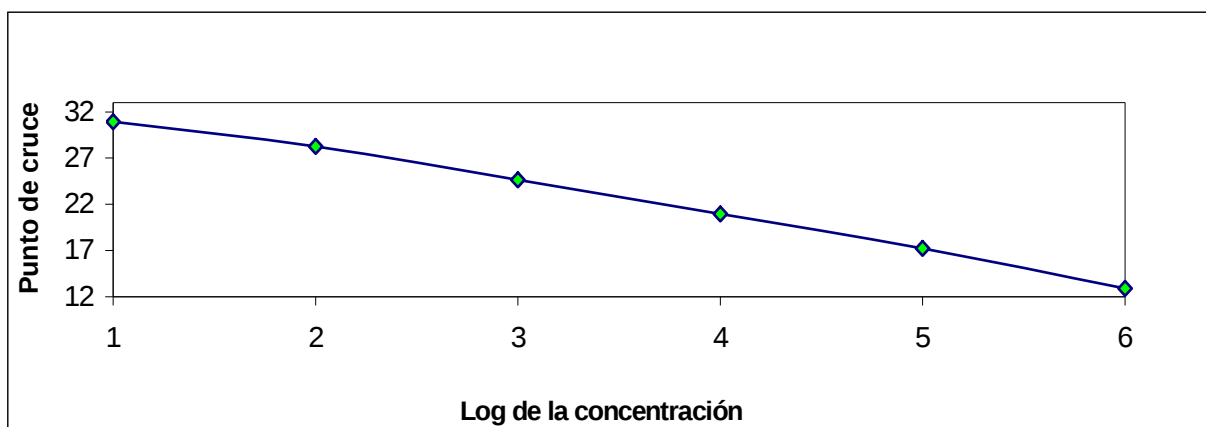


Figura 12. Regresión lineal del logaritmo de la concentración del plásmido. Regresión lineal del logaritmo de las concentraciones del plásmido ($50\text{-}10^{11}$) copias/ reacción. Punto de corte 50 copias por PCR tiempo real. Eficiencia óptima >1.7 y error < 0.05 .

De los 30 pacientes analizados: 11 tuvieron RVS al tratamiento y 19 de ellos no tuvieron RVS. El promedio del número de copias del ARN-VHC basal en cada grupo fue de 372,323 copias/reacción (5.5 log) y de 1,316139 (6.1 log) respectivamente. La diferencia en el número de copias entre ambos grupos mostró una diferencia significativa. (Tabla. 3)

En la segunda biopsia el número de copias del ARN-VHC fue no detectable en el grupo de pacientes con RVS y en el grupo de No RVS el número de copias de ARN-VHC disminuyó en forma significativa de 1,316139 a 513,505 copias/reacción, sin embargo la replicación del genoma viral se mantuvo por arriba del punto de corte.

Pacientes	Número de copias de ARN-VHC (Basal) copias/reacción	Log	Número de copias de ARN-VHC (Post- Tratamiento) copias/reacción	Log	<i>P</i>
RVS (n=11)	372,323 ± 621,979	5.5	No detectable	—	—
NO RVS (n=19)	1,316139 ± 2,316496	6.1	513,505 ± 137,665	5.7	0.049
<i>p</i>	0.075		—		

Tabla 3. Número de copias de ARN-VHC. El promedio de la número de copias del ARN-VHC en pacientes con VHC, antes y después del tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. Número de copias del ARN-VHC basal expresada en copias/reacción y logaritmo. $p \leq 0.05$ significativa.

d.- Expresión relativa de MRP-2

Se analizó un total de 60 biopsias hepáticas (30 biopsias basales y 30 postratamiento). La cuantificación relativa de MRP-2 se analizó en función a la expresión del gen constitutivo GADPH (Figura 13 y 14). Se determinó la razón de la expresión de MRP-2/GADPH como cuantificación relativa y la diferencia entre las muestras basales y postratamiento. Los resultados obtenidos se agruparon por RVS *versus* No RVS (Tabla. 4), genotipo 1 *versus* genotipo diferente a 1 (Tabla. 5). Se compararon medias y prueba no paramétrica de Wilcoxon, para muestras relacionadas y no relacionadas.

Pacientes con VHC	Basal	Post-Tratamiento	<i>p</i>
RVS (n=11)	10.9 ± 9.9	16.1 ± 28.9	0.646
NO RVS (n=19)	19.5 ± 20.9	15.0 ± 13.3	0.687
<i>p</i>	0.286	0.213	

Tabla 4. Expresión de MRP-2/GADPH en relación a la respuesta al tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina. Expresión de MRP-2/GADPH en biopsia hepática de pacientes con RVS (n=11), NO RVS (n=19) en condiciones basales y postratamiento. $p \leq 0.05$ significativa.

Pacientes con VHC	Basal	Post-Tratamiento	<i>p</i>
Genotipo 1 (n=21)	18.0 ± 20.6	15.9 ± 23.0	0.235
Genotipo $\neq$ 1 (n=9)	12.6 ± 8.9	14.3 ± 10.9	0.327
<i>p</i>	0.012	0.176	

Tabla 5. Expresión de MRP-2/GADPH en relación al Genotipo. Expresión de MRP-2/GADPH en biopsia hepática de pacientes con VHC portadores de genotipo 1 y portadores con genotipo diferente a 1, en condiciones basales y postratamiento. $p \leq 0.05$ significativa.

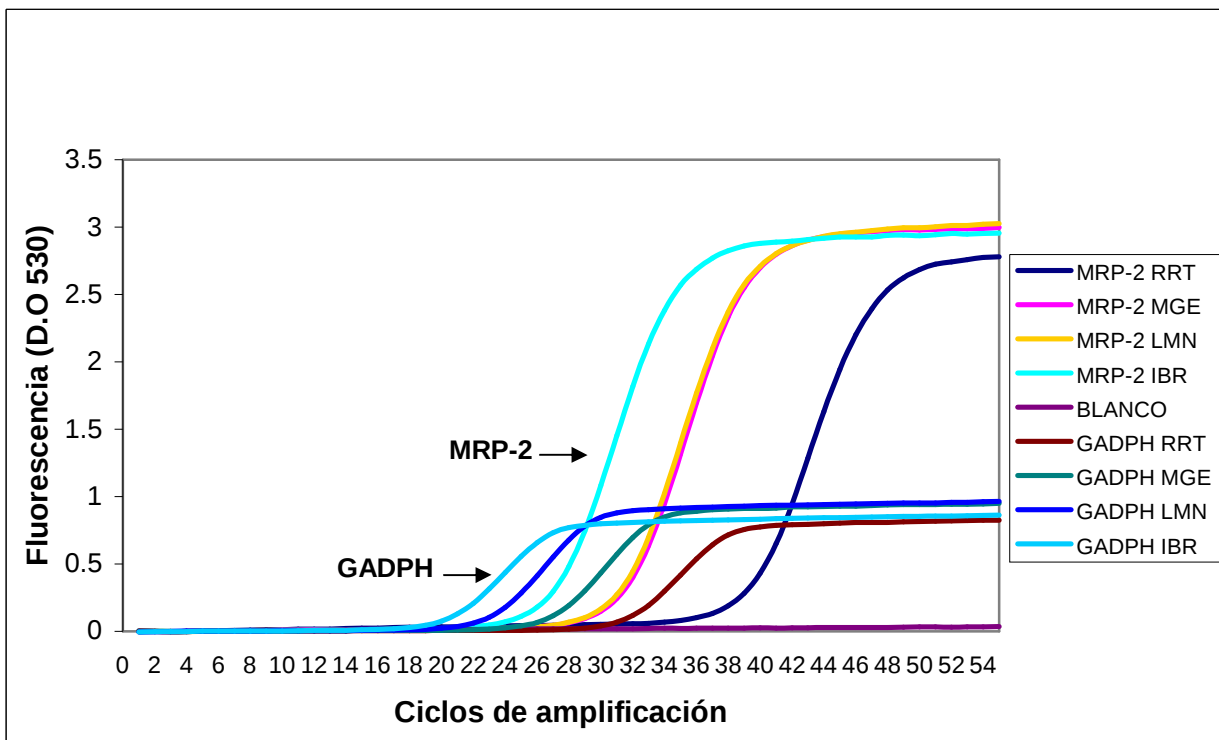


Figura 13. Curvas de amplificación de MRP-2 y GADPH en tejido hepático con VHC en condiciones basales.

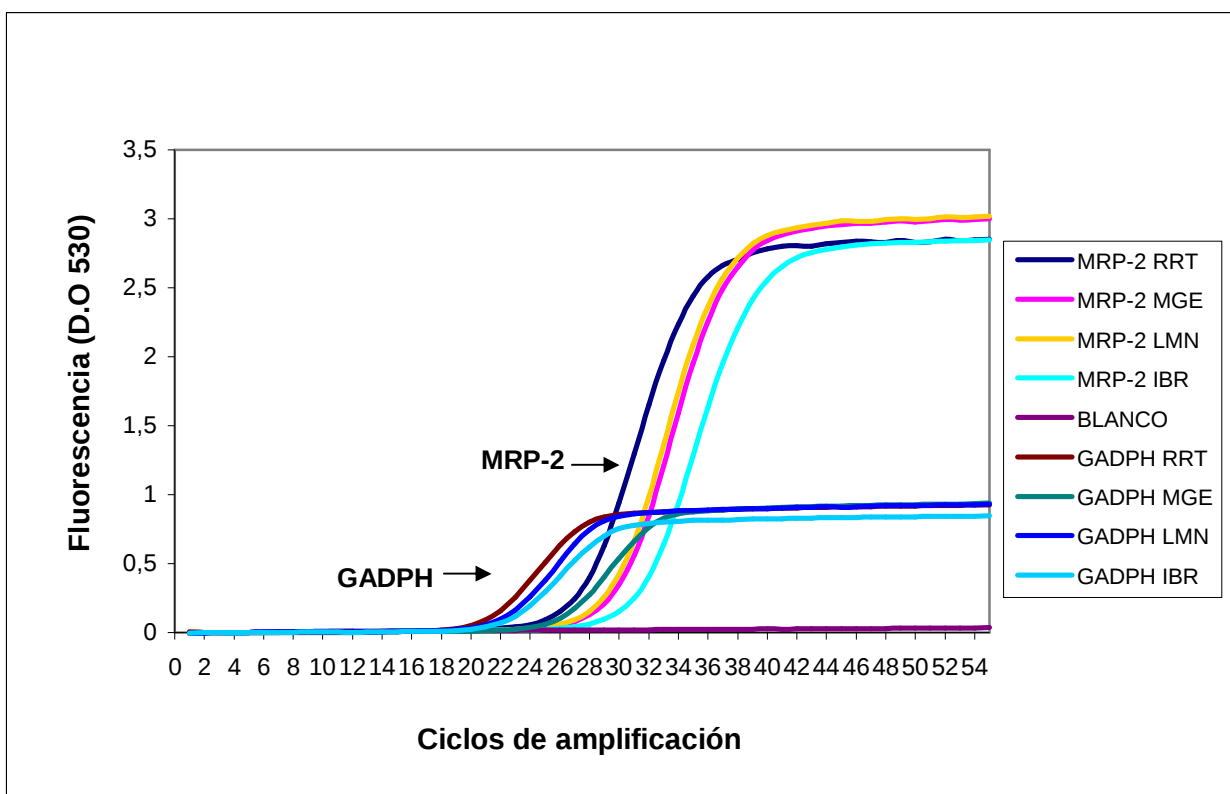


Figura 14. Curvas de amplificación de MRP-2 y GADPH en tejido hepático con VHC al término del tratamiento antiviral.

Se analizó el número copias de ARN-VHC en tejido hepático de pacientes infectados por virus C con respuesta viral sostenida y pacientes sin respuesta viral sostenida, antes de iniciar el tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. Los Pacientes con respuesta viral sostenida tuvieron $372,323 \pm 621,979$ copias de ARN-VHC por reacción (5.5 log), *versus* pacientes no respuesta viral sostenida $1,316,139 \pm 2,316,496$ copias de ARN-VHC por reacción (6.1 log), en condiciones basales. Tomando como punto de corte 50 copias/reacción, determinada por PCR tiempo real. $p \leq 0.05$ significativa.

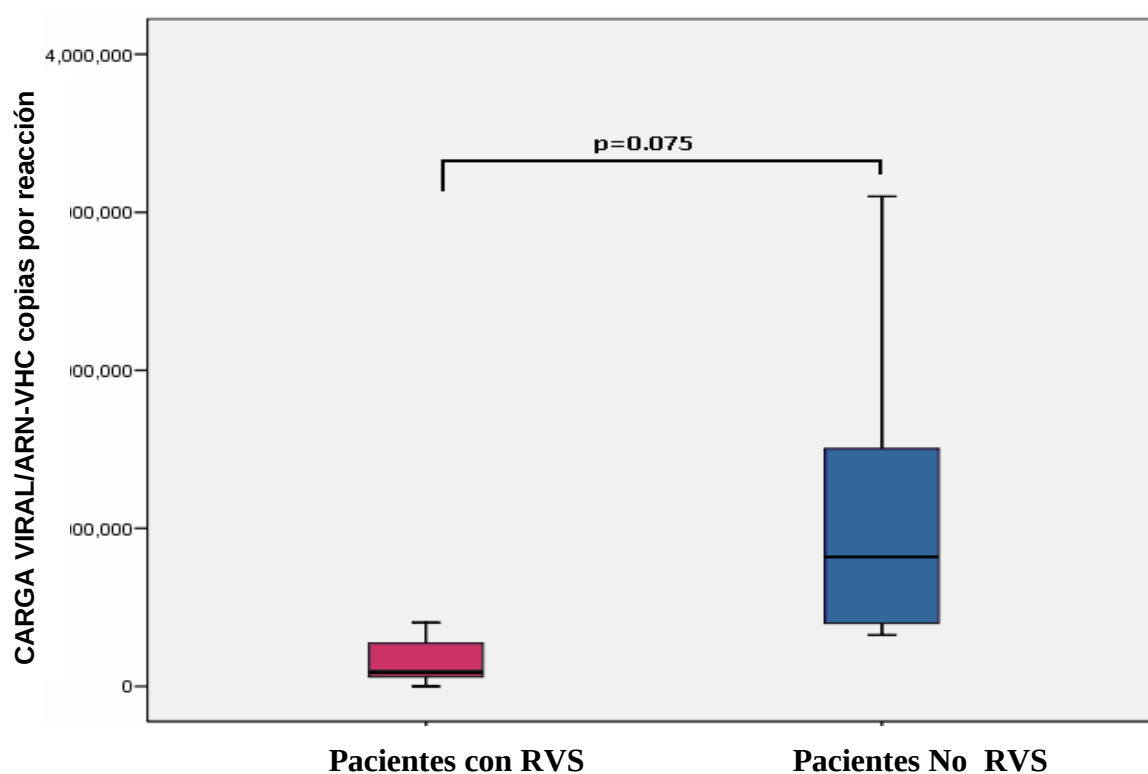


Figura 15. Número de copias de ARN-VHC en tejido hepático previa al tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.

Se analizó el número copias de ARN-VHC en tejido hepático de pacientes infectados por virus C con respuesta viral sostenida y pacientes sin respuesta viral sostenida, a seis meses de concluir el tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. En los pacientes con respuesta viral sostenida el número de copias de ARN-VHC fue no detectable y en los pacientes de no respuesta viral sostenida solo disminuyó $513,505 \pm 137,6657$ número de copias de ARN-VHC (5.7 log), tomando como punto de corte 50 copias/reacción, determinada por PCR tiempo real.

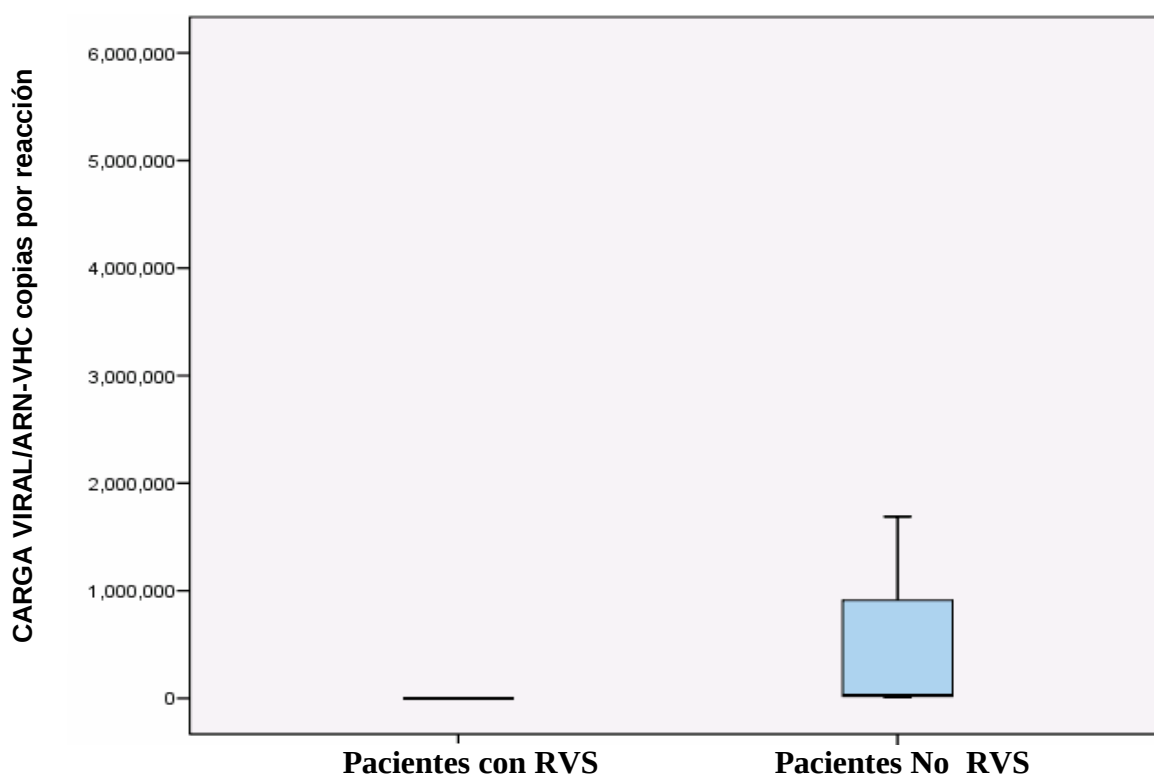


Figura 16. Número de copias del ARN-VHC en tejido hepático a 6 meses de concluir el tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.

Se analizó la expresión relativa de MRP-2 en tejido hepático de pacientes infectados por virus C con respuesta viral sostenida, antes y después de iniciar el tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. La expresión de MRP-2 en muestras pre-tratamiento fue de 10.9 ± 9.9 *versus* post-tratamiento 16.1 ± 28.9 . $p \leq 0.05$ significativa. Estadísticamente no hubo cambios significativos en la expresión de MRP-2, en pacientes con respuesta viral sostenida.

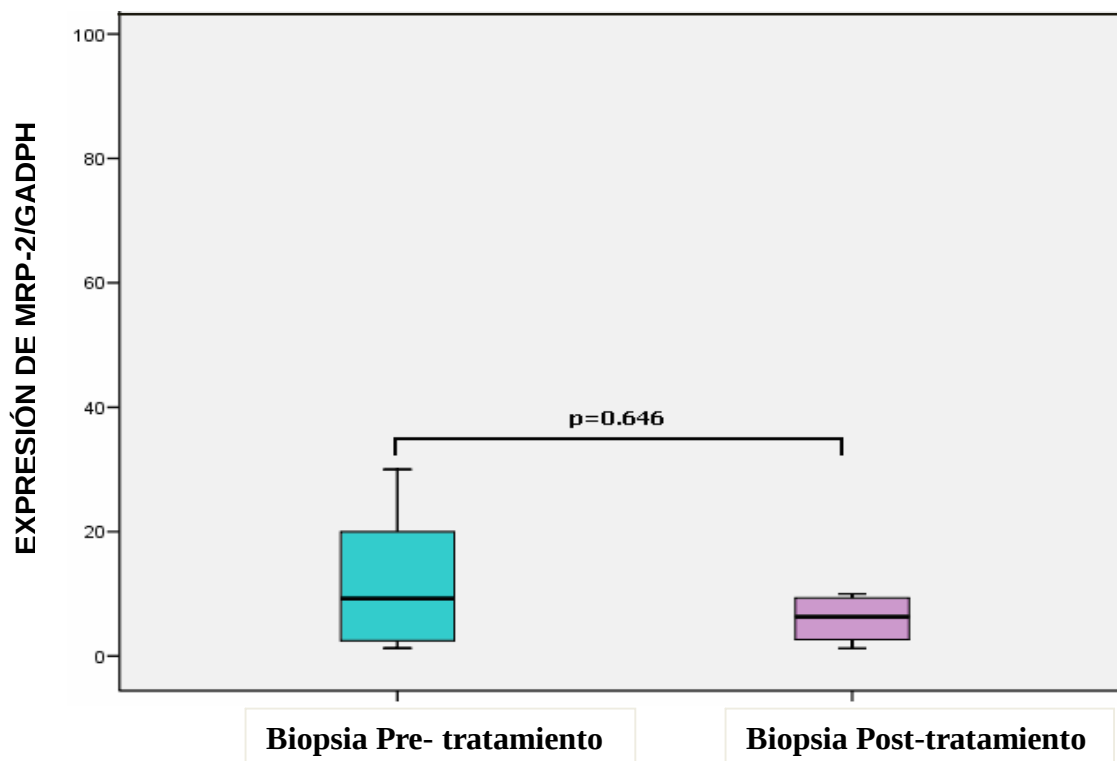


Figura 17. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC, respuesta viral sostenida al tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.

Se analizó la expresión relativa de MRP-2 en tejido hepático de pacientes infectados con hepatitis C crónica que no tuvieron respuesta viral sostenida, antes y a seis meses de concluir el tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. La expresión de MRP-2 en muestras pre-tratamiento fue de 19.5 ± 20.9 *versus* post-tratamiento 15.0 ± 13.3 . $p \leq 0.05$ significativa

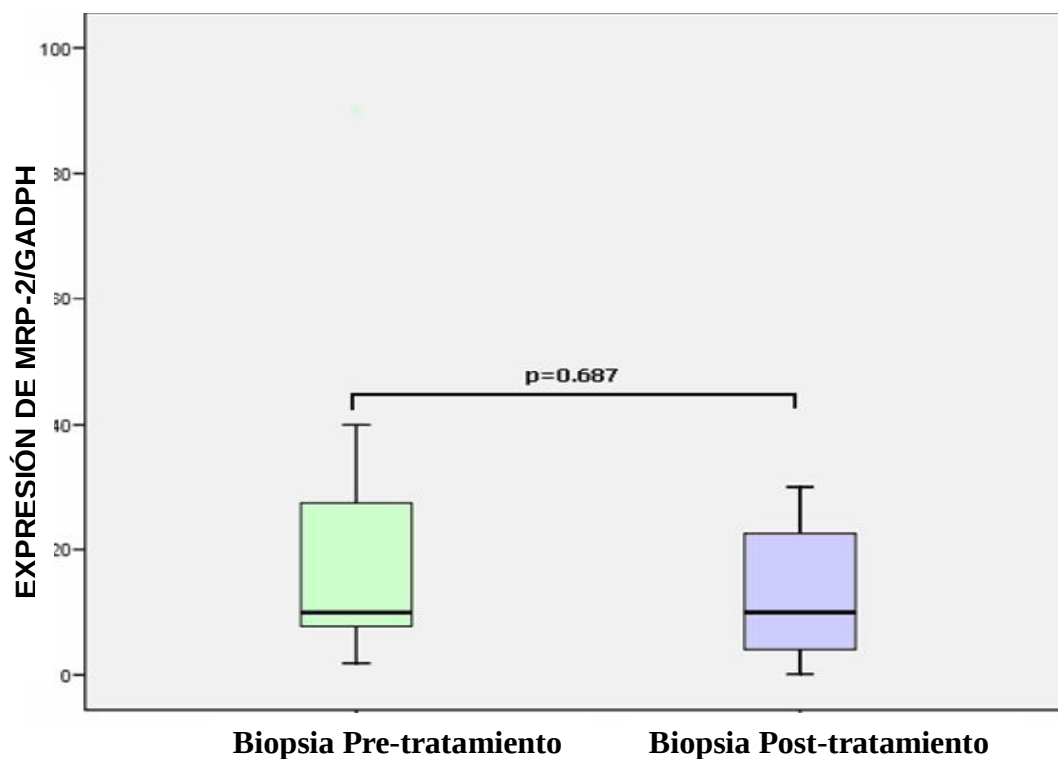


Figura 18. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes sin respuesta viral sostenida al tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.

Se analizó la expresión relativa de MRP-2 en tejido hepático de pacientes infectados con hepatitis C crónica portadores con genotipo 1, antes y a seis meses de concluir el tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. La expresión de MRP-2 no tuvo cambios significativos entre la biopsia pre-tratamiento 18.0 ± 20.6 y la biopsia post-tratamiento 15.9 ± 23.0 . $p < 0.05$ significativa.

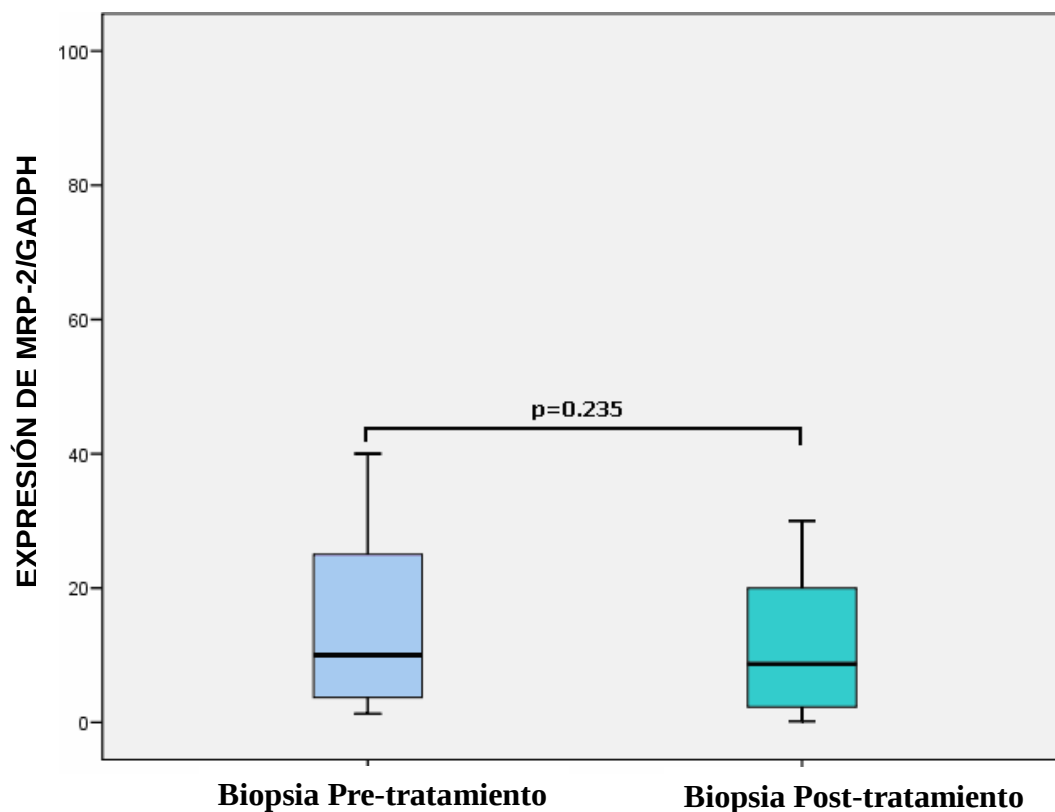


Figura 19. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC portadores con genotipo 1.

Se analizó la expresión relativa de MRP-2 en tejido hepático de pacientes infectados con hepatitis C crónica portadores con genotipo diferente a 1 (genotipo 2, 3 y 5) antes y a seis meses de concluir el tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. Los niveles de expresión de MRP-2 se mantuvo constante tanto en la biopsia pre-tratamiento 12.6 ± 8.9 como post-tratamiento 14.3 ± 10.9 . $p < 0.05$ significativa.

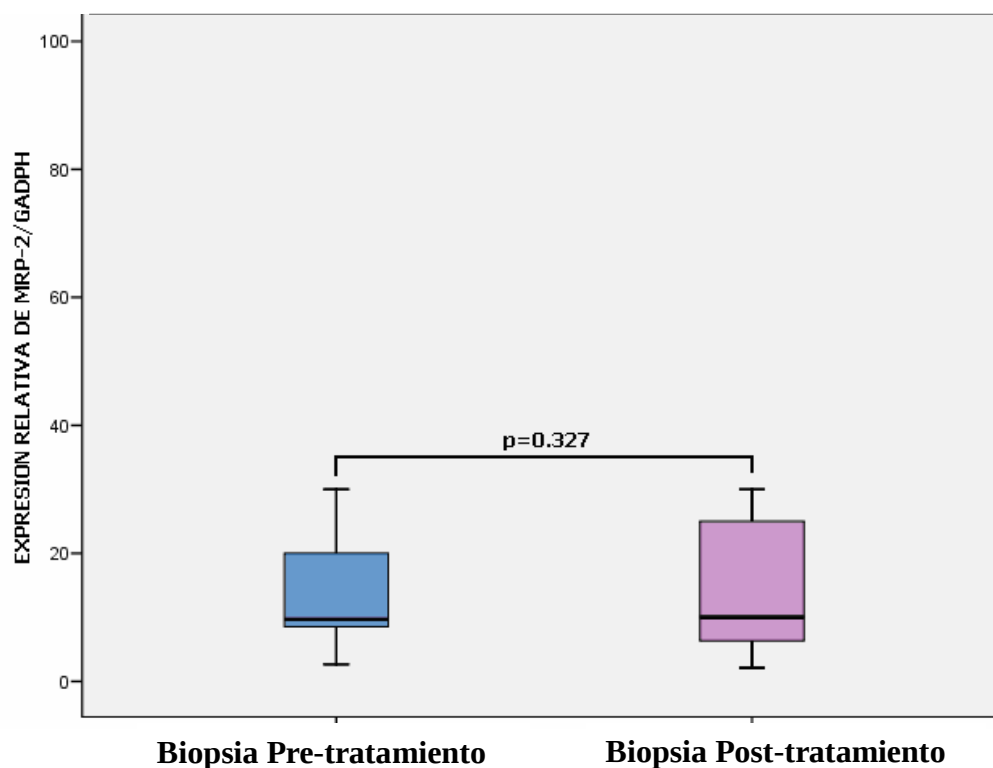


Figura 20. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC portadores con genotipo diferente 1.

Se analizó la expresión relativa de MRP-2 en relación al genotipo; pacientes infectados con hepatitis C crónica portadores con genotipo 1 y pacientes portadores con genotipo diferente a 1 (genotipo 2, 3 y 5) al inicio del tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. Los pacientes portadores con genotipo diferente a 1 tuvieron niveles de expresión de MRP-2 menores 12.6 ± 8.9 que los pacientes portadores con genotipo 1, 18.0 ± 20.6 . $p \leq 0.05$ significativa.

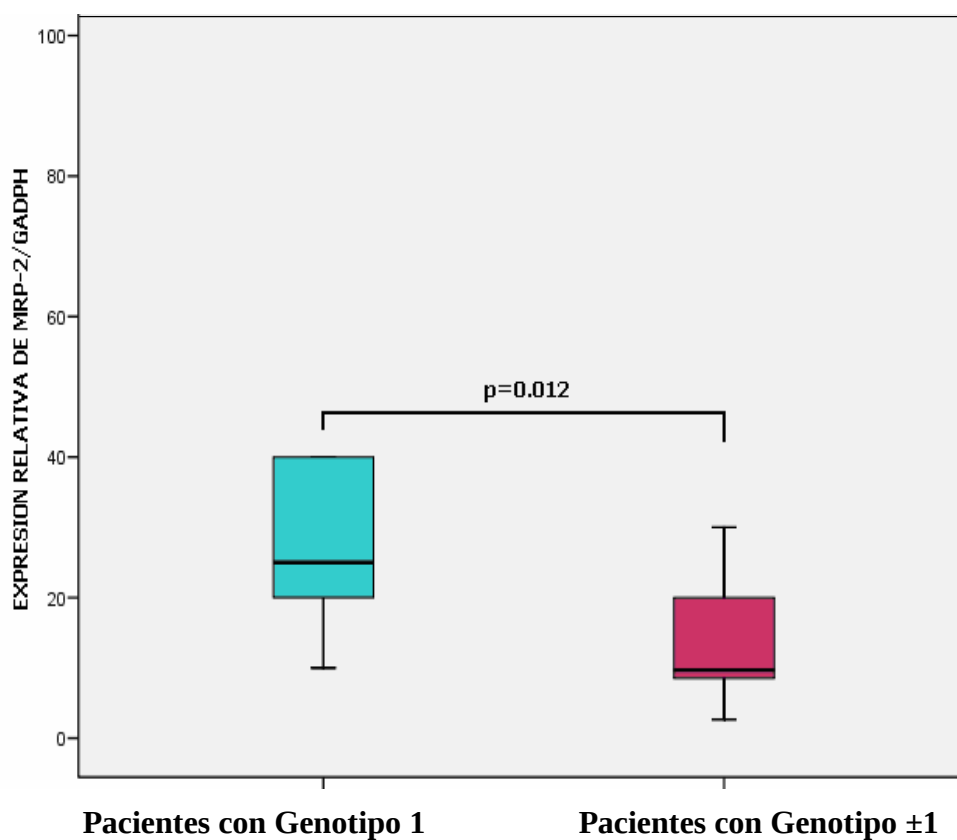


Figura 21. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC portadores con genotipo 1 y pacientes portadores con genotipo diferente 1 (2, 3 y 5), al inicio del tratamiento con PEG-INF α -2b y Ribavirina.

Se analizó la expresión relativa de MRP-2 en relación al genotipo; pacientes infectados con hepatitis C crónica portadores con genotipo 1 y pacientes portadores con genotipo diferente a 1 (genotipo 2, 3 y 5) al inicio del tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina. No hubo cambios significativos en la expresión de MRP-2 en ambos grupos 15.9 ± 23.0 versus 14.3 ± 10.9 . $p \leq 0.05$ significativa.

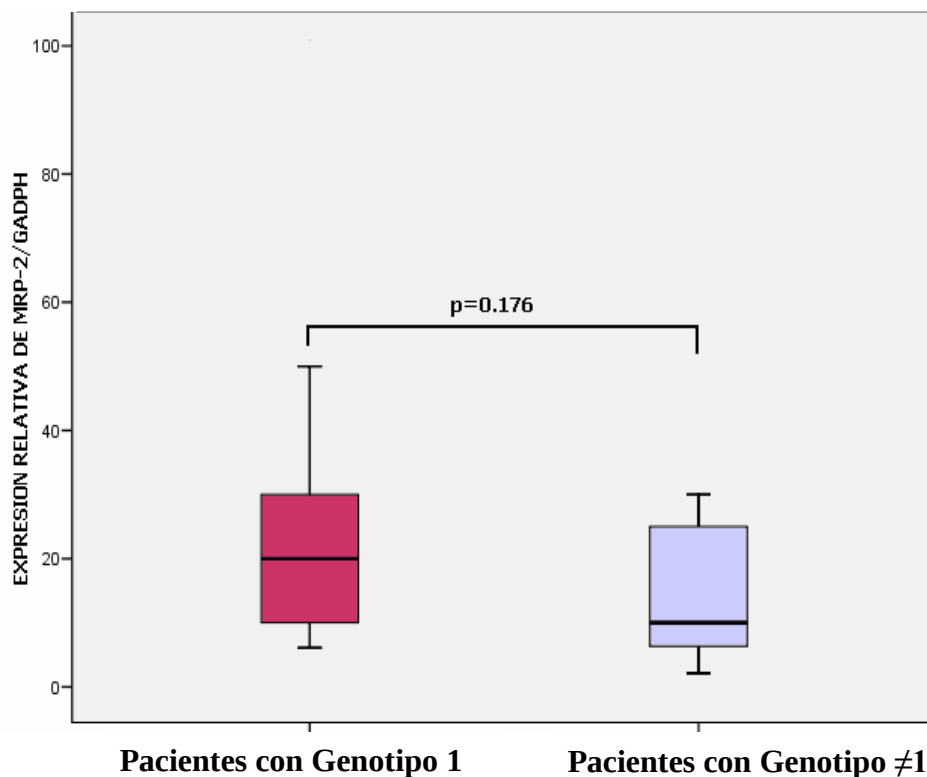


Figura 22. Expresión de MRP-2/GADPH en tejido hepático de pacientes con VHC portadores con genotipo 1 y genotipo diferente 1, al final del tratamiento.

Discusión

El virus de la hepatitis C causa daño hepático crónico, el cual progresa a fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma. Se ha descrito que existe elevado riesgo de cronicidad y una baja tasa de respuesta al tratamiento asociada a una amplia variedad de factores virales y genéticos del huésped, que eventualmente podrían determinar la progresión de la enfermedad y/o respuesta al tratamiento.

En la actualidad el tratamiento de elección para la infección crónica por virus C es el PEG-INF y ribavirina administrado durante 48 semanas a pacientes portadores de genotipo 1 y 24 semanas a pacientes portadores de genotipo diferente a 1(2,3 y 5). Sin embargo, la baja tasa de respuesta al tratamiento, el elevado costo, aunado a los efectos colaterales han sido problemas constantes no resueltos en el manejo de estos pacientes. ⁽⁵³⁾

Diversos factores han sido de gran importancia para predecir la respuesta al tratamiento antiviral, como son: el número de copias de ARN-VHC, el genotipo, grado de daño hepático, la dosis y duración del tratamiento antiviral. ⁽¹⁴⁾ Se ha demostrado que pacientes infectados con VHC portadores con genotipo 1 presentan un menor grado de respuesta viral sostenida al tratamiento con interferón (42 a 52%), mientras que aquellos pacientes portadores con genotipo 2 o 3 (78 a 86%). Así como pacientes infectados con VHC genotipos 4, 5 y 6 (50 a 77%). ⁽⁵⁵⁾

En nuestro grupo de estudio encontramos que la tasa de respuesta al tratamiento combinado, evaluado en tejido hepático fue de 38%, es decir solo 11 de 30 pacientes respondieron, de los cuales 8 pacientes fueron genotipo 1 y 3 genotipo diferente 1, este dato es menor al porcentaje reportado en la literatura que es de 50% basado en determinaciones del número de copias del ARN-VHC en sangre periférica.

Mientras que el 62% de ellos (13 pacientes portadores con genotipo 1 y 6 pacientes con genotipo diferente 1) no tuvieron respuesta aunque cabe destacar que disminuyeron en forma significativa el número de copias del ARN-VHC en el tejido hepático de 1,316,139 a 513,505 copias/reacción postratamiento. ($p= 0.049$).

Estos datos sugieren que aquellos pacientes que no erradicaron el virus, el tratamiento puede conferir un efecto protector ya que disminuye la replicación viral y con ello la persistencia de la inflamación, moderando el daño hepático por inflamación persistente, característica importante en la fisiopatogenesis de la enfermedad por VHC.

El análisis de los resultados de la respuesta al tratamiento evaluada en tejido hepático y su relación con el genotipo, no muestra diferencias importantes en pacientes portadores con genotipo 1 y pacientes portadores con genotipo diferente 1, es decir, en ambos casos la tasa de respuesta al tratamiento antiviral es baja. Estos resultados contradicen lo documentado ampliamente en la literatura donde se ha descrito al genotipo como un factor con valor pronóstico de respuesta.

Sin embargo, cabe destacar que el número de pacientes con genotipo diferente 1, incluido en nuestra muestra es muy pequeño por lo que es necesario evaluar un mayor número de pacientes para precisar si este factor es realmente sustentable de acuerdo a los resultados del número de copias de ARN-VHC obtenidos en el tejido hepático, así como evaluar otros parámetros histopatológicos como inflamación y daño histológico, además del tiempo de evolución de la enfermedad.

Así, podemos decir que aunque la evaluación de la respuesta al tratamiento antiviral en suero es prácticamente la alternativa mas accesible, no invasiva, económica y de uso generalizado en el diagnóstico de la hepatitis C, sobrestima la eficacia del tratamiento combinado con PEG-INF y ribavirina. Por lo que es más confiable y preciso determinar los cambios de la carga viral en tejido hepático y con ello la evaluación de la terapia antiviral y no en sangre periférica como comúnmente se realiza en estos pacientes.

Se ha demostrado que durante la replicación del virus C y/o de sus proteínas induce estrés oxidativo. El incremento de productos oxidativos está implicado en el daño tisular hepático por lo que su regulación es muy importante en la homeostasis de la función hepática.

La eliminación biliar de compuestos tóxicos de origen endógeno y exógeno son la principal defensa fisiológica de la función hepática.

Las proteínas transportadoras dependientes de ATP regulan el transporte de solutos orgánicos, la eliminación de compuestos tóxicos de origen endógeno y exógeno, la excreción de conjugados de bilirrubina, glutatión y glucoronidos, particularmente fármacos, entre ellos análogos de nucleósidos.

En la actualidad se sabe que la actividad biológica de las proteínas de múltiple resistencia a drogas participa de manera importante en la resistencia al tratamiento en enfermedades infecciosas y neoplásicas. ⁽⁵¹⁾

En este estudio determinamos la expresión del gen MRP-2 en un grupo de pacientes con infección crónica por virus C y su asociación con la respuesta al tratamiento antiviral y con el genotipo del VHC. Los resultados muestran que la expresión de MRP-2 es independiente de la respuesta al tratamiento antiviral.

La expresión de MRP-2 en pacientes con RVS y No RVS no muestra diferencias significativas en condiciones basales ni al final del tratamiento. ($p=0.646$) y ($p=0.687$) respectivamente.

De tal forma que podemos decir que la expresión de MRP-2 en este grupo de pacientes es similar y que no esta asociada al estado replicativo del virus, evaluado por el número de copias de ARN-VHC tanto en condiciones basales como al final del tratamiento. Estos resultados difieren a lo reportado por Ishtiaq y col. donde observaron un decremento del 29% en la expresión del ARNm de MRP-2 en un grupo de pacientes con infección por VHC con respecto al grupo control. ⁽⁵⁵⁾

Por otra parte, cuando se analizó la expresión de MRP-2 por diferencia de genotipo (genotipo 1 *versus* genotipo diferente 1), encontramos que los pacientes portadores con genotipo 1, en condiciones basales tuvieron mayor expresión de éste gen, mientras que los pacientes portadores con genotipo diferente 1, la expresión de de éste gen es significativamente menor ($p=0.012$).

Sin embargo, la expresión de MRP-2 no mostró cambios importantes al término del tratamiento antiviral ($p=0.176$), ya que ambos grupos expresan de forma semejante este gen y a pesar de que estadísticamente no es significativo, los datos en condiciones previas al tratamiento antiviral sugieren diferencia.

Probablemente la disminución en la expresión de MRP-2 en pacientes portadores de genotipo diferente a 1 en ausencia del tratamiento antiviral, se debe a que el grado de inflamación y daño hepático pudiera ser menor al que se presenta en pacientes portadores con genotipo 1, presentando un curso más benigno de la enfermedad. Esto es consistente con estudios previos, donde hay una correlación directa entre la disminución de la expresión de MRP-2 y el grado de inflamación hepática. ⁽⁵⁴⁾

Cabe mencionar que estas proteínas han sido ampliamente estudiadas en procesos neoplásicos donde el daño del tejido blanco es mayor y que en nuestro grupo de estudio aunque cursa con un estado de infección crónica de largo plazo, el daño hepático es compensado y la inflamación moderada.

Se ha reportado que la activación de factores de transcripción nuclear como son: el factor de regulación del interferón 3 (IRF-3), el factor nuclear hepático, 1 y 4 (HNF-1y HNF-4) regulan la expresión de MRP-2. ⁽⁵¹⁾

Conclusiones

- 1.- Los niveles de expresión de MRP-2 no se ven modificados por el número de copias del ARN-VHC.**
- 2.- En condiciones basales una menor expresión de MRP-2 podría estar asociada con el genotipo 2 del VHC.**
- 3.- La expresión de MRP-2 no esta asociada con la resistencia al tratamiento con PEG-INF α -2b y ribavirina**
- 4.- La respuesta al tratamiento combinado con PEG-INF α -2b y ribavirina en pacientes con infección crónica evaluada por el numero de copias del ARN-VHC en tejido hepático es menor que lo reportado en sangre periférica.**
- 5.-. Es recomendable evaluar la respuesta al tratamiento antiviral en biopsia hepática.**

Perspectivas

Evaluar la expresión de éstos factores transcripcionales y su papel en la regulación de la expresión de MRP-2 en esta población de estudio.

Así como, evaluar la expresión de MRP-2 durante el inicio y en estadios más avanzados de la enfermedad, como es el hepatocarcinoma, en donde el daño hepático es mayor y la función hepática se encuentra descompensada a fin de utilizar la expresión de MRP-2 como un posible marcador molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Mandujano, G. R., Figueroa, C. G. y Hernández, M. C. 2001. Hepatitis Viral tipo A. Salud en Tabasco. *SSAT*. 7(001): 366-371.
- 2.-Tratamiento para la hepatitis C. Dirección: www.pkids.org/Spa_phrctreat.pdf. Actualización: 5/02/2007. Acceso: 13/03/2007.
- 3.-Carreto V. M., Carrada B. T. y Martínez M. A. 2003. Seroprevalencia de VHB, VHC y VIH en donadores de sangre en Irapuato, México. *R.S.P.M.* **45**(supl. 5): S690-S693.
- 4.- Soza, A. y Marcelo L.L. 2006. Hepatitis C en Chile: Magnitud del problema. *Rev. Méd. Chile*. **134**: 777-788
- 5.- Gómez, C. I. y Álvarez, G. M. 2003. Biología y métodos diagnósticos del virus de la hepatitis C. *Rev Biomed*. **14**:254-255.
- 6.- Speziale, T. M. 2003. Hepatitis C- Historia natural y estado actual de su manejo. *Rev. Mex Patol Clín.* **50**(4): 182-189.
- 7.- Solá, R. 2003.Historia Natural de la hepatitis C. Gastroenterol Hepatol Monogr. **1**(2):1-41.
- 8.- Hepatitis C.Dirección:www.fundacionmexicanaparalassenfermedadeshepaticas.org Actualización: 25/08/06 Acceso: 22/05/07.
- 9.-Cristina, J. 2005. Variabilidad Genética del virus de la hepatitis C. *Rev. Biomed*. **1**(1) ISSN: 1510-9747.
- 10.- Pharmaceuticals. Dirección: www.viralgenomix.com/VGX410.html Actualización: 2/10/06 Acceso: 16/02/07
- 11.-Bartenschlager, R. y Lohmann, V. 2000. Replication of hepatitis C virus. *J.Gen.Virol.* **81**: 1631-1633.
- 12.-Jean, D. 2007. Hepatitis C virus proteins. *J.Gastroenterol.* **13**(17):2407-2411.

- 13.-Kato, N. 2001. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama*. **55**:133-159.
- 14.-Zein N. N. 2000. Clinical significance of hepatitis C genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:223–235.
- 15.- Cocquerel, L., Voisset, C. y Dubuisson, J. 2006. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J.Gen.Virol.* **87**:1075–1084.
- 16.-Cambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. y Rice C. M. 2000. Flavivirus genome organization, expresion and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**:649-688.
- 17.- Moradpour, D., Penin, F. y Rice, C. M. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Rev. Nature Reviews Microbiol.* 453-463.
- 18.- Wang, Q. C., Feng, Z. H. y Nie, Q.H . 2005. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T and B cell responses by dendritic cells expressing modified antigen targeting receptor. *World J Gastroenterol* **11**(4):557-560.
- 19.- Triyani, M., Vergalla, J. y Jake, L.T. 2002. Structural Features of envelope proteins on hepatitis C virus like particles as Determined by anti-envelope monoclonal antibodies and CD81 binding. *Virology*. **29**:124-132.
- 20.-Rehermann, B. y Nascimbeni, M. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection (2005). *Nature Publishing Group*. 5:215-229.
- 21.-Nakamura, I. y Imawari, M. 2000. Cellular immune response in HCV infection. *J Gastroenterol.* **35**:881-889.
- 22.-Boyer, N. y Marcellin, P. 2000. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol.* **32** (Suppl 1):98-112.
- 23.-Werteimer, A. M. y Rosen, R. 2003. Immunity and persitence in hepatitis C virus infection. *Current Hepatitis Reports.* **2**:152-158.
- 24.-Keeley, S. y Lake, J. R. 2003. Hepatitis C in the setting of kidney, heart, lung and bone marrow transplants. *Current Hepatitis Reports.* **2**:159-165.

- 25.- Martínez, E. A., Rodríguez, G. C. y Zozaya, J. M. 2004. Infección aguda por el VHC. *An. Sist. Sanit. Navar.* **27**(Supl. 2):59-68.
- 26.-Rituerto, C. A. y Taltavull, C.T. 2007. Hepatitis por el virus de la hepatitis C. *Control Calidad SEIMC.*
- 27.-Del Rosario, Q. M. y García, P.J. 2001. Sistema Interferón y estrés oxidativo. *Rev. Cubana. Invest. Biomed.* **20**(1): 73-80.
- 28.-Bruguera, C. 1994. Tratamiento con interferón en las hepatitis crónicas. *Med. Clin.***103**:498-504.
- 29.-Rowland, M. y Tozer, T. 1995. Clinical Pharmacokinetics. En: Concepts and Applications. (ed) Williams and Wilkins. 3.a Ed. Edit. Lippincott, Filadelfia.
- 30.-Patel, K. y McHutchison, J. 2001. Peginterferon alpha-2b: a new approach to improving response in hepatitis C patients. *Expert Opin Pharmacother.* **2**(1):307-1315.
- 31.-Sten-Knudsen, O. 1978. Concepts and models. En: Membrane transport in Biology. (ed) Tostesosn DC. Vol. 1. Edit. Springer-Verlag. Berlín. pp: 5-114.
- 32.-Rippe, B. y Haraldsson, B. 1994. Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiol Rev.* **74**: 163-219.
- 33.- Johnson, TP., Salamat-Miller, N. T. y Alur, H. H. 2003. An attempt to modulate the microporous difusión of a model polypeptide by altering its secondary structures. *Drug Deliv.* **10**:65-72.
- 34.-Perry, C.M. y Jarvis, B. 2001. Peginterferon-alpha-2a (40KDa): a review of tis use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs.* **61**:2263-2288.
- 35.-Glue, P., Fang, J.W. y Rouzier, R. 2000. Pegylated interferon-alpha 2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. *Clin Pharmacol Ther.* **68**:556-567.

- 36.- Flores, M., Castañeda, H y Medina, S.R. 2002. Biodisponibilidad y Bioequivalencia de los Medicamentos Genéricos. En: Bases Clínicas, Analíticas y Estadísticas. Ed. Roberto Medina Santillán. Edit. Asclepius XXI. México, D.F.
- 37.-Greenway, C.V. 1983. Role of splanchnic venous system in overall cardiovascular homeostasis. *Fed Prod.* **42**: 1.678-1.684
- 38.-Peginterferon pharmacokinetics in patients with end-stage kidney disease
Dirección: http://www.eliveronline.com/2003_10/2003_09_ART1.htm
Actualización: 24/02/03 Acceso: 3/03/07
- 39.- Kirchner, H. 1984. Interferons a group of multiple lymphokines. *Springer Semin Immunopathol.* **7**: 347-374.
- 40.-Charles, E.S. 1991. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14** (4):778-809.
- 41.- Brian, H., Clive, P. y Michael, C. 2004. Enfermedades del tracto respiratorio. En: Farmacología Integrada. 2ª Ed. Edit. Mosby, España. pp: 456.
- 42.- Feld, J. J. y Hoofnagle, H. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature Publishing Group.* **436**(18):967-972.
- 43.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas
Dirección: <http://www.famguerra.com/Meds/Search/Meds.cfm?pagina=38504.htm>
Actualización: 20/05/08 Acceso: 20/05/08
- 44.- Quijano, S. A. y Otero, L. E. 2006. Tratamiento de las hepatitis víricas (II). Tratamiento de la hepatitis crónica C. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin.* **24**(8):518-26.
- 45.- Gómez, R. MJ., Rodríguez S. A. y Morillo, M. M. 2002. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *An Med Interna.* 477-485.
- 46.-Sánchez, S. y Benítez, B. 2006. Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. *Cancerología.* **1**:187-199.

47.- Karther, N., Riordan J.R. y Ling, V. 1983. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*. **221**:1285-1288.

48.- Dean, M., Rzhetsky, A. y Allikmets, R. 2001. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Research*. **11**: 1156-1166.

49.-Keppler, D. y König, J. 1997. Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the *MRP2 (cMRP/cMOAT)* gene in liver. *The FASEB J*. **11**:509-516.

50.-Genatlas:Gene Database.

Dirección: <http://www.dsi.univ-pris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=ABCC2>

Actualización: 18/05/06

Acceso: 20/05/07

51.-Phillip, M. y Vore,M. 2002. Regulation of expression of Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2) and its Role in drug Disposition. *J Pharm and Exp Therap*. **302** (2): 409-410.

52.- Jedlitschky, G., Hoffmann, U. y Kroemer, H. 2006. Structure and function of the MRP-2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Drug Metab.Toxicol*. **2**(3):351-366.

53.- Qadri1, I., Iwahashi, M. y Francis R. S. 2006. Hepatocytes nuclear factors 1 and 4 (HNF1 & HNF4) mediates hepatic MRP2 up-regulation during hepatitis C virus gene expression. *Mol. Pharm*. 1-30.

54.- Taylor, W. M., Tsukahara, T., Brodsky, L., Schaley, J., Sanda, C., Stephens, J. M., Mc Clintick N. J., Edenberg, J. H., Li, L., Tavis, E. J. y Howell, C., Belle, H. S. 2007. Changes in Gene Expression during Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Distinguished Responders from Nonresponders to Antiviral Therapy. *J of Virol*. **81** (7): 3391-3401.

55.-Asselah, T., Beiche, I., Narguet, S., Sabbagh, A., Laurendeau, I., Ripault, M.P., Boyer, N., Martinotpeignoux, M., Valla, D., Vidaud, M. y Marcellin, P. 2007. Liver Gene Expression Signature to Predict Response to Pegylated interferon plus Ribavirin combination therapy in Patients with Chronic Hepatitis C. *Gut*.

56.- Hinoshita, E., Taguchi, K., Inokuchi, A., Uchimi, T., Kinukawa, N., Shimada, M., Tsuneyoshi, M., Sugimachi, K. y Kuwano, M. 2001. Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP-2, in human livers with hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 35: 765-773.

57.-Wohnsland, A., Hofmann, P.W. y Sarrazin, Christoph. 2007. Viral Determinants of Resistance to Treatment in Patients with Hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 20 (1):23-28.

ANEXO I

Primer 	Longitud	Posición	Tm	% GC	Secuencia
Sentido 	19	1817-1835	60	47	agcatgcttcccatgatga
Antisentido	20	1859-1878	60	47	tctagccgctctgtggaaac
Amplificón (62 pb) agcatgcttcccatgatgatctcctccatgctccaggccagtgttccacagagcggctaga					

gataattcctgttccacttttctttgatgaaacaagtaaagaagaacaacacaatcatatta
atagaagagtcttcgttccagacgcagtcagggaatcatgctggagaagttctgcaactcta
ctttttggaattcctcattcctggacagtcggaggcagacctgccactttgttttgagcaa
actgttctgggtgtggattcccttgggcttcctatggctcctggccccctggcagcttctcca
cgtgtataaatccaggaccaagagatcctctaccacaaactctatcttgctaagcaggat
tcgttgggttttcttcttattctagcagccatagagctggcccttgactcacagaagactct
ggacaagccacagtccttgcgtgttcgatataccaatccaagcctctacctaggcacatggct
cctgggttttgctgatccaatacagcagacaatgggtgtgtacagaaaaactcctggttcctgt
ccctattctggattctctcgatactctgtggcactttccaatttcagactctgatccggaca
ctcttacagggtgacaattctaatactagcctactcctgcctgttcttcatctcctacggatt
ccagatcctgatcctgatcttttcagcattttcagaaaaataatgagtcataaataatccat
catccatagcttcattcctgagtagcattacctacagctgggtatgacagcatcattctgaaa
ggctacaagcgtcctctgacactcgaggatgtctgggaagttgatgaagagatgaaaacca
gacattagttagcaagtttgaaacgcacatgaagagagagctgcagaaagccaggcgggcac
tccagagacggcaggagaagagctcccagcagaactctggagccaggctgcctggcttgaac
aagaatcagagtcaaagccaagatgcccttgtcctggaagatgttgaaaagaaaaaaagaa
gtctgggaccaaaaaagatgttccaaaatcctgggtgatgaaggctctgttcaaaactttct
acatgggtgctcctgaaatcattcctactgaagctagtgaatgacatcttcacgtttgtgagt
cctcagctgctgaaattgctgatctcctttgcaagtgaccgtgacacatatattgtggattgg
atatctctgtgcaatcctcttattcactgcggtctcattcagcttttctgccttcagtggt
atttccaactgtgcttcaagctgggtgtaaaagtacggacagctatcatggcttctgtatat
agaaggcattgaccctatccaacttggccaggaaggagtagaccgttggagaaacagtga
cctgatgtctgtggatgccagaagctcatggatgtgaccaacttcatgcacatgctgtggt
caagtgttctacagattgtcttattctatcttcttccctatggagagagttgggaccctcagtc
ttagcagggtgttgggtgatgggtgcttgtaatcccaattaatgcgatactgtccaccaagag
taagaccattcagggtcaaaaatatgaagaataaagacaaacgtttaagatcatgaatgaga
ttcttagtggaatcaagatcctgaaatatatttgcctgggaaccttcattcagagaccaagta
caaaacctccggaagaaagagctcaagaacctgctggcctttagtcaactacagtgtgtagt
aatattcgcttccagtttaactccagtcctgggtatctgtgggtcacattttctgtttatgtcc
tgggtggatagcaacaatatatttggatgcacaaaaggccttcacctccattacctcttcaat
atcctgcgctttcccctg→agcatgcttcccatgatga←tctcctccatgctccaggccagt
gttccacagagcggctaga←gaagtacttgggaggggatgacttggacacatctgccatt
cgacatgactgcaattttgacaaagccatgcagttttctgaggcctcctttacctgggaaca
tgattcggaagccacagtcggagatgtgaacctggacattatggcaggccaacttgtggctg
tgataggccctgtcggctctgggaaatcctccttgatatcagccatgctgggagaaatggaa

attcagaatggcaccataaaggacaacatccttttttggaaacagagttaaataaaaagaggta
ccagcaagtactggaggcctgtgctctcctcccagacttggaatgctgcctggaggagatt
tggctgagattggagagaaggggtataaatcttagtgggggtcagaagcagcggatcagcctg
gccagagctacctacaaaatttagacatctatcttctagatgacccccctgtctgcagtgga
tgctcatgtaggaaaacatatTTTTaataaggtcttgggccccaatggcctgttgaaaggca
agactcgactcttggttacacatagcatgcactttcttccctcaagtggatgagattgtagtt
ctgggggaatggaacaattgtagagaaaggatcctacagtgcctcctggccaaaaaaggaga
gtttgctaagaatctgaagacatttctaagacatacaggccctgaagaggaagccacagtcc
atgatggcagtgagaagaagacgatgactatgggctgatatccagtgtggaagagatcccc
gaagatgcagcctccataaccatgagaagagagaacagcttctgtcgaacacttagccgcag
ttctaggtccaatggcaggcatctgaagtccctgagaaactccttgaaaactcggaatgtga
atagcctgaaggaagacgaagaactagtgaaggacaaaaactaattaagaaggaattcata
gaaactggaaaggtgaagttctccatctacctggagtagctacaagcaataggattgttttc
gatattcttcatcatccttgcgtttgtgatgaattctgtggcttttattggatccaacctct
ggctcagtgccttgaccagtgactctaaaatcttcaatagcaccgactatccagcatctcag
aggacatgagagttggagtctacggagctctgggattagcccaagggtatatttgtgttcat
agcacatttctggagtgccttgggttctgtccatgcatcaaatatcttgcacaagcaactgc
tgaacaatatccttcgagcacctatgagatttttgacacaacacccacaggccggattgtg
aacaggtttgccggcgatatttccacagtggatgacaccctgcctcagtccttgcgcagctg
gattacatgcttcttggggataatcagcacccttgtcatgatctgcatggccactcctgtct
tcaccatcatcgctcattcctcttggcattatttatgtatctgttcagatgttttatgtgtct
acctcccgccagctgaggcgctctggactctgtcaccagggtccccaatctactctcacttcag
cgagaccgtatcaggtttgccagttatccgtgcctttgagcaccagcagcgatttctgaaac
acaatgaggtgaggattgacaccaaccagaaatgtgtcttttcttggatcacctccaacagg
tggcttgcaattcgccctggagctgggtgggaacctgactgtcttcttttcagccttgatgat
ggttatttatagagataccctaagtggggacactgttggccttgttctgtccaatgcactca
atatcacacaaaccctgaactggctgggtgaggatgacatcagaaatagagaccaacattgtg
gctgttgagcgaataactgagtacacaaaagtggaaaatgaggcacccctgggtgactgataa
gaggcctccgccagattggcccagcaaaggcaagatccagtttaacaactaccaagtgcggt
accgacctgagctggatctggtcctcagagggatcacttgtgacatcggtagcatggagaag
attggtgtggtgggcaggacaggagctggaaagtcacccctcacaactgcctcttcagaat
cttagaggctgccggtggtcagattatcattgatggagtagatattgcttccattgggctcc
acgacctccgagagaagctgaccatcatccccaggaccccatcctgttctctggaagcctg
aggatgaatctcgacccttcaacaactactcagatgaggagatttggaaaggccttgagct
ggctcacctcaagtcttttgtggccagcctgcaacttgggttatccacgaagtgacagagg
ctgggtggcaacctgagcataggccagaggcagctgctgtgcctgggcagggtctgtctcg
aaatccaagatcctggtcctggatgaggccactgctgcggtggatctagagacagacaacct
cattcagacgacctccaaaacgagttcgcccactgcacagtgatcaccatcgcccacaggc
tgcacaccatcatggacagtgacaaggtaatggtcctagacaacgggaagattatagagtgc

Figura 23. Secuencias nucleotídicas del ARNm de MRP-2. (Tomado de: <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/center.jsp?id=030000>).

Gen	Símbolo	Localización	Expresión	Función
ABCC1	MRP-1, GS-S	16q13.1	Membrana basolateral	Transportador
ABCC2	MRP-2, cMOAT	10q24	Hígado, riñón	Transportador
ABCC3	MRP-3, MOAT-B	17q21.3	Hígado, riñón	Transportador
ABCC4	MRP-4, MOAT-C	13q32	Ubiquitina	Transportador
ABCC5	MRP-5, MOAT-D	3q27	Ubiquitina	Transportador
ABCC6	MRP-6, MOAT-E	16p13.1	Hígado y riñón	Transportador
CFTR	ABCC7	7q31.2	Pulmón	Canal
ABCC8	SUR1	11p15.1	Páncreas	Receptor
ABCC9	SUR2	12p12.1	Músculo y corazón	Receptor
ABCC10	MRP7	6p21	Baja	Transportador
ABCC11	MRP8	16q11-q12	Baja	Transportador
ABCC12	MRP9	16q11-q12	Baja	Transportador
ABCC13		21q11.2	Hígado fetal y bazo	Transportador no funcional

Tabla 6. Lista de genes ABCC humano. ABC: Casete de unión a ATP: regulador de conductancia transmembranal de fibrosis cística (CFTR) ; transportador canicular multipespecífico de aniones orgánicos (cMOAT), exportador de conjugados de glutatión dependientes de ATP (GS-X), proteína asociada a resistencia a múltiples drogas (MRP), receptor de sulfonilurea (SUR).

INFORME PARA EL CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TITULO DEL ESTUDIO: Tratamiento combinado, ponderado por pero, con Peg-interferón alfa-2b más Ribavirina en pacientes mexicanos con Hepatitis C crónica sin tratamiento previo.

PATROCINADOR: Schering Plough S.A. de C.V.
Av 16 de septiembre No. 301.
Col. Xaltocan. Xochimilco
C.P.16090. México, D.F.

INVESTIGADORES: Dr. Juan Francisco Sánchez Avila
Dra. Graciela Castro Narro
Dr. Aldo Montañó
Dra. Florencia Vargas Vorackova
Dr. Misael Uribe Esquivel
Dra. María del Carmen Flores Miranda
Dr. Francisco Cárdenas

Departamento de Gastroenterología
Departamento de Psiquiatría
Departamento de Oftalmología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición "Salvador Zubirán".
Vasco de Quiroga No. 15
Del. Tlalpan. C.P. 14000
México, D.F.

TELÉFONO: (5255) 5573 3418
(5255) 5487 0900 ext 2713

INTRODUCCIÓN

Antes de que Ud. Decida participar en este estudio de investigación es importante que lea y comprenda la siguiente explicación de los procedimientos que se proponen. Esta declaración describe el propósito,

los procedimientos, los beneficios, riesgos, molestias y precauciones de este estudio. También describe los procedimientos alternativos que están

Iniciales del voluntario: _____

Fecha: _____

a su disposición y su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. No podemos garantizar ni asegurar los resultados de este estudio.

PROPÓSITO

Se le invita a participar de este estudio porque tiene hepatitis C crónica. Lo estamos invitando a participar en este estudio de investigación que evalúa la efectividad, seguridad y tolerabilidad del tratamiento combinado con Peginterferon alfa 2b y Ribavirina en pacientes mexicanos (fármacos utilizados como tratamiento de primera línea en el tratamiento de la hepatitis C crónica). Peginterferon alfa 2b es un interferón de liberación lenta, se trata de una sustancia que constituye una forma esencial para el tratamiento de la hepatitis C, y que ha sido aprobada por la Secretaría de Salud para el tratamiento de este tipo de hepatitis. En este estudio se evaluará la seguridad de los fármacos y la tolerancia del paciente al recibirlos. Se le invita a participar del estudio por un período de 72 a 96 semanas. Se solicitará la participación del estudio a 100 sujetos en un centro de investigación.

SELECCIÓN

Si Ud. Decide participar del estudio, se le efectuarán pruebas de selección destinadas a confirmar si, desde el punto de vista médico, Ud. es un candidato apropiado para este tratamiento. En la visita mencionada usted completará las siguientes pruebas de selección:

- examen físico y revisión de su historia clínica
- se registrarán sus signos vitales incluyendo peso y altura
- estudios de laboratorio, incluyendo pruebas de función hepática, pruebas de función tiroidea, química sanguínea, alfafetoproteína, análisis de VIH y hepatitis.
- prueba de embarazo para las mujeres
- ultrasonido de hígado
- biopsia hepática
- Evaluación en el departamento de Psiquiatría
- Evaluación en el departamento de Oftalmología

El investigador le hará preguntas sobre sus hábitos de uso de tabaco y sobre el método anticonceptivo que utiliza.

En el departamento de psiquiatría será evaluado por un especialista quien le realizará una entrevista personal y le realizará unas pruebas que valoran si usted padece depresión o ansiedad y otra que valora las funciones mentales superiores. Esta visita durará aproximadamente de 30 a 45 minutos en total.

En el departamento de Oftalmología será evaluado para la búsqueda de alteraciones en sus ojos, incluyendo el fondo del mismo, por lo que se le administrará un medicamento local (gotas) las cuales podrían interferir con una visión nítida durante un par de horas.

Los resultados de estos estudios ayudarán al investigador a decidir si usted es apto para participar de este estudio.

Iniciales del voluntario: _____

Fecha: _____

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Con el fin de poder participar de este estudio debe cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

- Edad entre 18 – 70 años, hombre o mujer
- Su sangre debe ser positiva para el virus de la hepatitis C
- El funcionamiento de su hígado debe ser normal y los resultados de sus estudios del hígado debe ser inferiores o iguales a 10 veces el límite superior de los valores normales
- Los valores de los estudios de laboratorio deben encontrarse en valores que no contraindiquen el tratamiento antiviral combinado
- Usted debe estar de acuerdo en utilizar un método de control de embarazo seguro durante el estudio y los 6 meses posteriores a la finalización del estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Usted no puede participar si se cumplen alguno de los siguientes puntos:

- Si usted es alérgico al Interferón o a la Ribavirina
- Si usted participó en cualquier estudio clínico dentro de los 30 días anteriores a comenzar este estudio.
- Si usted recibió un tratamiento con un fármaco que esté siendo investigado dentro de los 30 días previos a comenzar este estudio
- Si usted padece de alguna enfermedad del hígado que no sea hepatitis C crónica
- Si usted es VIH positivo
- Si usted es hemofílico o padece de alguna otra enfermedad que requiera de anticoagulantes (medicación que retarda la coagulación de la sangre)
- Si su enfermedad del hígado es avanzada
- Si usted tiene algún órgano trasplantado
- Si usted tiene cualquier enfermedad que pudiese interferir con su participación en el estudio y completar el mismo
- Si usted tuvo problemas psiquiátricos graves, en particular depresión severa
- Si usted es alcohólico o drogadicto
- Si usted cuenta con un trastorno psiquiátrico importante (como la depresión)
- Si usted tiene problemas con la retina del ojo
- O bien si usted tuviere algún otro problema de salud según el criterio del investigador, que pueda interferir con la participación en el estudio.

TRATAMIENTO Y PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Si usted participa en este estudio deberá acudir al centro de tratamiento en al menos 12 ocasiones separadas. Las visitas ambulatorias están separadas por un período de 2 a 6 semanas durante 48 a 72 horas de duración del tratamiento de estudio.

Durante las visitas ambulatorias será necesario que se someta a los siguientes procedimientos:

- Examen físico con toma de signos vitales

Iniciales del voluntario: _____

Fecha: _____

- Peso
- Pruebas de seguridad de laboratorio a las semanas basal, 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 48 semanas y en caso de requerirse cada 6 a 12 semanas hasta la semana 72.
- Confirmación de que usted sigue métodos anticonceptivos
- Evaluación en el departamento de psiquiatría aproximadamente cada tres meses o en caso de ser necesario más frecuentemente (una o dos veces por mes)
- Evaluación en el departamento de Oftalmología, aproximadamente cada tres meses o en caso necesario , más frecuentemente, en caso de que se detecten alteraciones en sus ojos.

La cantidad de sangre que se extraerá en cada visita es de aproximadamente 20 ml (2 a 4 cucharadas soperas) dependiendo de la visita.

El personal del estudio le enseñará a administrarse las inyecciones de Peginterferon. Si así lo desea, también se instruirá a otra persona de su casa a aplicar la inyección. Cada inyección deberá aplicarse con aguja y jeringa estándar, que contendrá alrededor de una décima parte de una cuchara sobera.

Su médico le explicará cómo almacenar el medicamento del estudio. Usted debe seguir cuidadosamente estas indicaciones. Cada vez que acuda al hospital para revisiones, debe usted traer las tabletas y los frascos que sobren, así como los recipientes y empaques vacíos o parcialmente usados para que su médico le proporcione más medicamento. Si usted llegara a perder alguno de sus medicamentos del estudio, por favor comuníquelo inmediatamente a su médico.

Es necesario que asista a sus citas conforme a lo programado y que siga todas las instrucciones que le explique el personal del estudio.

Durante el período de tratamiento, usted debe acudir a sus visitas tal como lo indique su médico. En estas visitas se extraerá sangre (aproximadamente 2 cucharadas soperas) con el fin de verificar la evolución de su hepatitis C y su estado de salud. Regularmente, se colectará también su orina. A las mujeres fértiles se les hará una prueba de embarazo (después de la visita de la semana 6 se le pedirá que se realice pruebas de embarazo en cada visita programada).

Cada vez que acuda al médico se le interrogará sobre cualquier signo o síntoma poco habitual que haya sentido desde su última visita. Es muy importante que informe esto a su médico de la manera más completa posible.

Si el tratamiento con los medicamentos del estudio no mejora su hepatitis después de las primeras 12 semanas de tratamiento o después de las primeras 24 semanas de tratamiento, lo que se valorará con las mediciones de la cantidad de virus en sangre, su médico decidirá si debe usted continuar el tratamiento o de virus en sangre, su médico decidirá si debe usted continuar el tratamiento o suspenderlo y pasar directamente a la fase de seguimiento del estudio.

Iniciales del voluntario: ____

Fecha: _____

Esto se debe a que es probable que el virus no se alcance a eliminar con el tratamiento empleado.

Si continúa en el estudio después de la valoración a la semana 12 ó 24 semanas, seguirá tomando el medicamento de estudio durante otras 48, 36 ó 24 semanas más.

Debido a que el estudio se está llevando a cabo para evaluar los medicamentos previamente mencionados, no está permitido que usted tome otros medicamentos contra el virus de hepatitis C durante el período del estudio. Su médico recibirá todos los resultados de sus análisis de sangre y los discutirá con usted.

Si usted acude a otro médico, es necesario que le comente que esta participando en este estudio para que él pueda ponerse en contacto con el médico del estudio en caso de ser necesario.

Un segundo medicamento, Ribavirina, se le administrará con un régimen de dos tomas diarias durante la fase de tratamiento. Usted tomará este medicamento en su casa junto con las comidas.

Los medicamentos del estudio se le proporcionarán sin costo alguno para usted.

FASE DE SEGUIMIENTO

La tercera parte es un período de observación de 24 semanas, sin tratamiento. Usted continuará siendo evaluado para detectar clínicamente por el médico del estudio, por el departamento de psiquiatría y oftalmología y con exámenes de laboratorio por lo menos dos veces durante esta fase del estudio.

Si el médico le suspende el tratamiento del estudio por cualquier motivo, usted estará en observación cuando menos doce semanas después de la última dosis.

Esto se hace para identificar y dar tratamiento a cualquier efecto secundario del medicamento.

Molestias, malestares y otros riesgos

La administración de Peginterferon puede producir dolor de cabeza, debilidad, fiebre, fatiga o náuseas, leve pérdida de pelo (reversible) y depresión, insomnio (dificultades al dormir) o irritabilidad. Además el fármaco puede causar reducción en el recuento de sus glóbulos blancos. Sus leucocitos (glóbulos blancos) son los que lo defienden de las infecciones, por lo cual usted podrá desarrollar una mayor susceptibilidad a las mismas. Este aspecto será supervisado cuidadosamente a través de los análisis de seguridad de laboratorio y en caso que la cantidad de sus glóbulos blancos llegase a disminuir por debajo del nivel aceptable, será modificada o interrumpida la administración del fármaco.

Iniciales del voluntario: _____

Fecha: _____

Los medicamentos del estudio se le proporcionarán sin costo alguno para usted.

El tratamiento con la combinación de Peginterferon y Ribavirina causa anemia (disminución del recuento de glóbulos rojos) y causa una disminución en recuento de sus plaquetas (que son las células encargadas de que la coagulación de la sangre sea normal). Ambos serán supervisados durante el tratamiento y en caso que los valores sean inferiores a los normales, la administración del fármaco será modificada o interrumpida. La rápida disminución de las cuentas de glóbulos rojos puede asociarse en raras ocasiones con dificultad para respirar y con molestias del corazón. También es posible que usted sufra náusea, vómito y molestias abdominales.

En general, la mayoría de los efectos secundarios (con la posible excepción de alteración de la función de la tiroides) son reversibles al suspender el tratamiento.

Puesto que Peginterferon se administra mediante inyección bajo la piel, es posible que tenga dolor, enrojecimiento o hinchazón en el lugar de la inyección.

Otro de los inconvenientes es el lugar de inserción de la aguja de inyección para la extracción de sangre. La extracción de sangre es levemente dolorosa y puede causar moretones y, en raras ocasiones, desmayos, coágulos de sangre o una infección en el lugar de la extracción.

La Ribavirina puede producir defectos congénitos TANTO las mujeres como los hombres fértiles deben practicar DOS métodos anticonceptivos médicamente eficaces mientras estén recibiendo Ribavirina y durante seis meses después.

Biopsia del Hígado: este procedimiento consiste en obtener una pequeña muestra de su hígado para analizar los efectos de la Hepatitis C en el tejido. Su médico le aplicará anestesia local y extraerá la muestra con una aguja especial. Puede presentar malestar, dolor, formación de moretones y, raramente, sangrado en el sitio de la punción.

Riesgos desconocidos

El tratamiento puede encerrar riesgos habitualmente imprevistos para usted, incluyendo la posibilidad de una reacción alérgica a lo(s) fármaco(s). En caso que usted llegase a tener cualquier efecto colateral adverso, deberá informar de inmediato al personal afectado del estudio. En el caso de presentarse cualquier evento(s) adverso(s) o reacción(es) adversa(s) relacionados con la investigación usted recibirá la atención médica convencional.

Toda nueva información acerca de este estudio de investigación que este disponible durante el transcurso del mismo y que pueda influir en su decisión para continuar participando en el estudio se le comunicará.

Iniciales del voluntario: _____

Fecha: _____

Beneficios

Es posible que su hepatitis C se cure, estabilice o mejora debido al tratamiento con los medicamentos es estudio. Sin embargo, es posible que el Peginterferon en combinación con Ribavirina no cure su hepatitis, y puede ser que su condición permanezca sin cambios o podría empeorar durante tu participación en el estudio. Además, usted será visto por un equipo profesional de especialistas y se le realizarán los estudios necesarios para evaluar su condición de salud. Los medicamentos del estudio no tendrán ningún costo para usted. El resto de los procedimientos y exámenes correrán por cuenta suya.

También, usted estará ayudando a otros pacientes, proporcionando información importante sobre el tratamiento de la hepatitis C crónica.

Usted resultará beneficiado si su enfermedad responde al tratamiento.

Tratamiento alternativo

El personal del estudio podrá trata su hepatitis C con un tratamiento convencional aprobado.

Riesgo de embarazo

Desconocemos los efectos del Peginterferon sobre el feto. Los estudios en animales demostraron claramente que el Peginterferon, administrado a animales embarazados, puede resultar en la muerte del producto en desarrollo o en malformaciones congénitas. Por este motivo usted no puede participar de este estudio si está embarazada o en período de lactancia, o bien si tiene previsto un embarazo. Usted tampoco puede participar del estudio si tiene la intención de embarazarse dentro de los 6 meses posteriores a la participación del estudio.

Si es usted hombre o mujer deberá utilizar un método de control de embarazo médicamente aceptable (esterilización, píldoras anticonceptivas, implantes Norplant, preservativos junto con pomada anticonceptiva) durante el período de tratamiento y durante los 6 meses posteriores a la terminación del estudio.

Si usted llegase a quedar embarazada o llegase a engendrar un hijo dentro de los 6 meses posteriores a su participación del estudio, usted deberá informar de inmediato al médico del estudio, para que pueda recibir el asesoramiento apropiado. En caso de que usted quedase embarazada durante el estudio, se le retirará de inmediato el mismo.

Indemnización/Costos

Conforme a la decisión ya sea del patrocinador del estudio (Schering Plough o del médico a cargo, se le podrá retirar del estudio si usted no cumpliera con las instrucciones, si se presentará algún problema médico que según el criterio de su médico pudiera afectar su salud, o bien si el estudio se interrumpiera por cualquier otro motivo.

Iniciales del voluntario: _____

Fecha: _____

Sin embargo, si usted se retirara del estudio por cualquier otro motivo, teniendo en cuenta su seguridad y protección y en su propio interés, se le invitará para someterse a un examen físico final y a una extracción de sangre para poder efectuar las pruebas de laboratorio antes de que se retire del estudio.

Declaración del participante

Su firma indica que usted informó a los médicos del estudio sobre todas sus enfermedades y alergias pasadas y presentes de la cuales tiene conocimiento; indicará que no está tomando ningún medicamento que no haya puesto en conocimiento del médico del estudio, o ninguna sustancia ilegal de ningún tipo durante todo el período de duración del estudio.

Informe de los resultados y confidencialidad

Se harán todo los esfuerzos para proteger la confidencialidad de sus registros médicos. El patrocinador o su representante revisarán sus registros médicos para asegurar que es usted apto para participar del estudio y de que el estudio será efectuado conforme a lo previsto por el investigador.

Si los resultados de este estudio de investigación se publicasen en revistas científicas o en libros, no se dará a conocer ni se revelará su nombre ni ninguna información que pudiera identificarlo. Los resultados del estudio serán entregados a Schering Plough, la compañía que produce Peginterferon. La Secretaría de Salud, las autoridades del Instituto y Schering Plough también podrían solicitar ver sus registros médicos que salgan de esta institución se eliminarán todos los datos de identificación (como por ejemplo nombre, direcciones, número de seguro social, etc).

Indemnización por daños

Si usted sufriera algún daño corporal o algún evento adverso inesperado como resultado directo de su participación en este estudio, se le proporcionara tratamiento médico habitual. Tal tratamiento debe autorizarlo el médico del estudio, y el patrocinador debe confirmar que el médico ha cumplido con el plan del estudio. Usted no renuncia a ninguno de sus derechos legales con la firma de este formulario.

Si usted sufriera de alguna lesión o algún problema médico de urgencia, sírvase contactarse con el **Dr. Juan Francisco Sánchez Ávila**, a los teléfonos **5573 3418, 5487 0900 ext. 2713 ó radiolocalizador 56 29 98 00 clave 9960898**.

Derecho a retirarse

Su participación en este estudio de investigación voluntaria. Tiene derecho a negarse a participar en este estudio de investigación, o a interrumpir su participación en cualquier momento. Usted no perderá ningún beneficio que le correspondiere. En caso de tener cualquier tipo de pregunta no dude en consultarnos. Usted puede llamar al **Dr. Antonio Cabral Castañeda, Coordinador del Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos al teléfono: 54 87 09 00 ext. 2301**, en caso que tuviere preguntas sobre sus derechos como sujeto que participa de un estudio de investigación.

Iniciales del voluntario: _____

Fecha: _____

Si usted tuviere preguntas de carácter médico durante el estudio sírvase contactarse con el Dr. Juan Francisco Sánchez Ávila, a los teléfonos 5573 3418, 5487 0900 ext. 2713 ó radiolocalizador 56 29 98 00 clave 99 60898.

Entiendo que cualquier información o muestra (como sangre, orina, tejido) recolectada durante este estudio puede usarse en investigaciones y en el desarrollo del fármaco del estudio. El patrocinador no tiene intenciones de proporcionarme ningún beneficio de propiedad o financiero que pueda resultar de esta investigación o de productos comerciales futuros.

Le daremos una copia firmada de este formulario para la cual pueda conservar en su poder.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

DECLARACIÓN Y FIRMA DEL PACIENTE

He leído este consentimiento informado y he tenido la oportunidad de discutir su contenido con el Dr. _____. He tenido oportunidad de hacer preguntas acerca de los procedimientos del estudio, sus inconveniencias, riesgos y posibles efectos secundarios. Se ha dado respuesta a todas mis preguntas a mi completa satisfacción. Toda la información verbal y por escrito y las pláticas sobre el estudio que se me han proporcionado han sido en mi propio idioma (Español). Mi firma indica que voluntariamente consiento en particular en este estudio después de haber leído detenidamente, entendido y recibido una explicación completa de la anterior información. Entiendo que puede decidir retirarme del estudio en cualquier momento sin que esto afecte mi atención médica futura en la institución participante. He recibido una copia completa de este documento, incluyendo las firmas y los datos que a continuación aparecen.

I. Nombre y Firma del paciente (y del representante legal en caso de que aplique):

Nombre completo	Fecha
-----------------	-------

Firma

Dirección del paciente

Número de teléfono del paciente

El suscrito, ha explicado ampliamente los detalles de este estudio al paciente cuyo nombre aparece arriba (o a su representante legal en caso de que aplique).

II. Nombre y firma del investigador (o del médico que haya explicado el consentimiento):

Nombre completo	Fecha
-----------------	-------

Firma

Iniciales del voluntario: _____

Fecha: _____

III. Nombre y firma de un primer testigo:

Nombre completo	Fecha
------------------------	--------------

Firma

Dirección del paciente

Relación o Parentesco con el paciente

IV. Nombre y firma de un segundo testigo:

Nombre completo	Fecha
------------------------	--------------

Firma

Dirección del paciente

Relación o Parentesco con el paciente

Iniciales del voluntario: _____

Fecha: _____

GLOSARIO

Antígenos: Cualquier sustancia que tiene la facultad, en circunstancias adecuadas, de producir respuesta inmunitaria específica y de reaccionar con los productos de esta respuesta, esto es, con anticuerpo específico, linfocito T específicamente sensibilizados o ambos.

Anticuerpos: Son glicoproteínas (proteínas unidas a azúcares) secretadas por un tipo particular de células, los plasmocitos. Los plasmocitos son el resultado de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B que han sido activados. Su propósito es reconocer cuerpos extraños invasores como las bacterias y virus para mantener al organismo libre de ellos. La producción de anticuerpos forma parte de la respuesta inmune humoral.

Astenia: (del gr. A-/an, “negación” y sthénos, “vigor” o “fuerza”). Se describe como falta de energía o vigor. Es un síntoma general, que puede aparecer en múltiples enfermedades, tanto orgánicas como funcionales.

Cirrosis de hígado: El tejido normal y sano es reemplazado por un tejido cicatrizal que bloquea el flujo de sangre a través del órgano e impide que trabaje como debería.

Citopático: Perteneciente o relativo a cambios patológicos en las células o caracterizado por ellos.

Cuasiespecies: son la traducción de la heterogeneidad genética viral en un mismo individuo.

Dominios: En inmunología, cualquiera de las regiones de homología de las cadenas pesadas y ligeras de polipéptidos de las inmunoglobulinas.

Flavivirus: Subcategoría de togavirus; la especie tipo es el virus de la fiebre amarilla.

Fibrosis: es la formación o desarrollo en exceso de **tejido conectivo** fibroso en un órgano o tejido como consecuencia de un proceso reparativo o reactivo.

Gen: Es la unidad básica de herencia de los seres vivos. Desde el punto de vista molecular, un gen es una secuencia lineal de nucleótidos en la molécula de ADN, que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica.

Genotipo: Es el contenido genético (el genoma específico) de un individuo, en forma de ADN. Junto con la variación ambiental que influye sobre el individuo, codifica el fenotipo del individuo.

Glomerulonefritis: Variedad de nefritis, caracterizada por inflamación de las asas capilares de los glómerulos renales. Ocurre en forma aguda, subaguda y crónica y puede ser secundaria a infecciones por estreptococo hemolítico.

Glicoproteínas: Cualquiera de las proteínas conjugada, que constan de un compuesto de proteína y un grupo carbohidrato. Se distinguen por que bajo descomposición.

Glutación: Tripéptido, γ -glutamil-cistinil-glicina, compuesto por ácido glutámico, cistina y ácido aminoacético, se aísla de tejidos animales y vegetales. Es la coenzima de la glioxalasa y actúa como transportador respiratorio de oxígeno.

Helicasa: Es una enzima que participa en el proceso de síntesis de proteínas en la transcripción y en la traducción. Su función es romper los puentes de hidrógeno (H) que une las bases nitrogenadas para poder copiar la secuencia 3'5' que es la hebra molde.

Infección: Es el término clínico para la colonización de un organismo huésped por especies exteriores.

Inflamación: Se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generada por los agentes inflamatorios.

Interferón: Es una proteína produciendo naturalmente por el sistema inmunitario de la mayoría de los animales como respuesta a agentes externos, tales como virus, bacterias, parásitos y células cancerígenas.

Intrón: Es una región de ADN comprendida en la región codificante de un gen pero que no se llega a expresar, es decir, su secuencia no se utiliza cuando se sintetiza la correspondiente proteína. Los intrones se transcriben pero no se traducen, por ello, son regiones no codificantes.

Leucocito: Célula o corpúsculo blanco de la sangre, cuya función principal es la defensa del organismo de sustancias ajenas o agentes infecciosos.

Linfocito: Leucocito mononuclear de 1 a 20 μ de diámetro con núcleo que se tiene profundamente, contiene cromatina densa y citoplasma que adopta una coloración azul pálida.

MRP-2: es un transportador de aniones orgánicos conjugados con glutatión, sulfato o ácido glucurónico, localizado en la membrana apical del hepatocito y del enterocito.

Mutación: Es una alteración o cambio en la información genética de un ser vivo y que, por lo tanto, va a producir un cambio de características, que se presenta súbita y espontáneamente, se puede transmitir o heredar a la descendencia.

Proteasa: Término general con el que se designan las enzimas proteolíticas.

Receptor: Molécula específica ubicada sobre la superficie de la célula o dentro del citoplasma de ésta, que reconoce a otras moléculas específicas y las fija, como el grupo químico sobre la superficie de una célula inmunosuficiente que fija un antígeno, a las moléculas celulares que fijan moléculas de hormonas o de neurotransmisores y reaccionan con otras moléculas que actúan de manera específica.

Ribavirina: (C₈H₁₂N₄O₅) Antivirótico de nombre químico, 1 β - D-ribofurasonil-1 H-1,2, 4- triazol-3 carboxamida. La Ribavirina trifosfato inhibe la enzima ARNm – guanililtransferasa inhibiendo la síntesis de ARNm vírico y también ARN polimerasa.

Técnica de ELISA: (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

Transaminasa: Enzima que cataliza la transferencia reversible de un grupo amino desde ácido α -amino hasta un α -cetoácido, por lo general α -cetoglutarico. Actúan como coenzimas piridoxal 5-fosfato y fosfato de piridoxamina.

Virión: Partícula viral completa que se encuentra fuera de las células y puede sobrevivir en forma cristalina e infectar a las células vivientes, esta constituida por el nucleóide (material genético y la cápside).

Vinca: Género de hierbas apocináceas leñosas que incluye a la vincapervinca o hierba doncella.

Virus: (de la palabra latina *virus*, toxina o veneno) es una entidad biológica capaz de autorreplicarse utilizando la maquinaria celular. Es un agente potencialmente patógeno compuesto por una cápside de proteínas que envuelve al ácido nucleico, que puede ser ADN o ARN.

Xenobiótico: Compuesto externo a un organismo vivo que interacciona con él, generalmente a través de alteraciones metabólicas.