

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA, ADIPONECTINA  
Y SUS RECEPTORES EN PACIENTES CON HEPATITIS C.**

**Por:**

Q.F.B. Miguel Ángel Ríos Guerra

Como requisito parcial para obtener el Grado de:  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

**JULIO 2007**

## **Aprobación de Tesis:**

---

DRA. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA  
**Director de Tesis**

---

DRA. PAULA CORDERO PEREZ  
**Comité de Tesis**

---

DRA. LINDA ELSA MUÑOZ ESPINOSA  
**Comité de Tesis**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA, ADIPONECTINA Y SUS RECEPTORES  
EN PACIENTES CON HEPATITIS C.**

Presentado por:

**Miguel Ángel Ríos Guerra**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Hígado del Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, bajo la asesoría de la Dra. C. Ana María Rivas Estilla.

Firmas

---

**DRA. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA**  
**Director de Tesis**

---

**DRA. PAULA CORDERO PEREZ**  
**Comité de Tesis**

---

**DRA. LINDA ELSA MUÑOZ ESPINOSA**  
**Comité de Tesis**

**DEDICATORIA:**

**Esta tesis está dedicada a:**

Mi esposa Olvia Guerrero Toledo

Y

Mis guías en este proceso: Dra. Ana María Rivas Estilla, Dra. Paula Cordero Pérez  
y Dra. Linda Elsa Muñoz Espinosa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente deseo agradecer a mi esposa Olivia Guerrero Toledo, que siendo aún mi novia durante el desarrollo de este trabajo me apoyó durante todo el tiempo y siempre estando allí para animarme en las buenas y en las malas.

A mis compañeras y amigas Amanda Berenice Mercado, Liliana Torres y Briceidy Emericela Garza por su apoyo en Unidad de Hígado durante mi trabajo de tesis.

A mis compañeros de generación y amigos(as): Daniel Cervantes, Guadalupe Martínez , Olivia Álvarez, Clara Ríos, Karina Trujillo, Ángel Lugo, Víctor Kardash por siempre estar allí cuando los necesitaba, darme apoyo y momentos de alegría durante mi estancia en el Departamento de Bioquímica.

A la Dra. Ana Maria G. Rivas Estilla por guiarme en el desarrollo de mi tesis, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de investigación y por la confianza que siempre depositó en mi persona.

A la Dra. Paula Cordero por haberme enseñado tanto, por su bondad, sinceridad y franqueza durante mi estancia en Unidad de Hígado.

A la Dra. Linda Muñoz Espinosa por haberme permitido formar parte de su departamento, aprender de sus conocimientos, también por participar en la revisión de esta tesis y por sus comentarios a la misma.

Al Dr. Homero Zapata Chavira por su apoyo en la realización del presente proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado como beca para el desarrollo de mi tesis de maestría.

Al fondo PAICYT por el apoyo económico brindado para el desarrollo del trabajo experimental de mi tesis de maestría (PAICYT 2006 SA1467-06.)

A todas las personas que donaron un poco de si mismos para la obtención de las muestras biológicas empleadas en mi trabajo de tesis.

A Dios por todas las cosas buenas que me ha dado a lo largo de la vida y que me han servido para crecer y superar las adversidades.

## INDICE

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>III</b>
<b>NOMENCLATURA.....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VIII</b>

### **CAPITULO I. INTRODUCCIÓN**

1.1	Definición de Hepatitis C.....	1
1.1.1	El VHC en México.....	1
1.2	Agente etiológico de la Hepatitis C	
1.2.1	Estructura del VHC.....	2
1.2.2	Sitios de replicación del VHC.....	5
1.2.3	Clasificación del VHC.....	6
1.2.4	Implicación clínica del genotipo de VHC.....	7
1.2.5	El VHC y su relación con esteatosis y síndrome metabólico.....	7
1.2.5.1	Esteatosis Metabólica.....	9
1.2.5.2	Esteatosis inducida por el VHC.....	10
1.2.6	Regulación del metabolismo por adipocinas y su relación al síndrome metabólico.....	11
1.2.6.1	Leptina.....	12
1.2.6.2	Adiponectina.....	13
1.2.7	Justificación del Estudio.....	17

### **CAPITULO II. OBJETIVOS**

2.1	Objetivo General.....	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18

### **CAPITULO III. ESTRATEGIA GENERAL.....**

19

### **CAPITULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

4.1	Sujetos incluidos en el estudio. ....	20
4.1.1	Criterios de inclusión generales.....	20
4.1.2	Sujetos VHC y controles hepatópatas.....	20
4.1.3	Controles sanos.....	20
4.1.4	Criterios de exclusión.....	20
4.1.5	Grupos de estudio.....	21
4.2	Material	
4.2.1	Origen de los reactivos.....	21
4.2.2	Material Biológico.....	22
4.3	Equipo.....	23

4.4	Métodos	
4.4.1	Obtención de sangre periférica de los sujetos de estudio	24
4.4.1.1	Obtención de suero y plasma en EDTA	25
4.4.2	Extracción de RNA	
4.4.2.1	Extracción de RNA total de tejido adiposo o CMN	25
4.4.2.2	Análisis electroforético del RNA	26
4.4.2.3	Reacción de Retrotranscripción (RT) para la obtención de cDNA	27
4.4.2.4	Cuantificación de cDNA total	28
4.4.2.5	Diseño de iniciadores de PCR	28
4.4.2.6	Reacciones de PCR de GAPDH y genes de interés	29
4.4.2.7	Determinación de las enzimas hepáticas, glucosa y perfil de lípidos	29
4.4.2.8	Determinación de lípidos totales	30
4.4.2.9	Cuantificación de insulina	32
4.4.2.10	Cuantificación de adiponectina y leptina séricas	33
4.4.2.11	Determinación del índice de masa corporal (IMC) e índice cintura cadera (ICC)	34
4.4.2.12	Determinación del Índice HOMA	34
4.4.2.13	Ensayo de PCR Cualitativo de VHC	34
4.4.2.14	Determinación de genotipo del VHC	35
4.4.2.15	Determinación de carga Viral de VHC	36

## **CAPITULO V. RESULTADOS**

5.1	Obtención de CMN de sangre periférica de los sujetos de estudio y controles	38
5.2	Extracción de RNA	
5.2.1	Extracción de RNA total de tejido adiposo	38
5.2.2	Extracción de RNA total de CMN	39
5.2.3	Reacción de Retrotranscripción (RT) para la obtención de cDNA	39
5.2.4	Diseño de oligonucleótidos y estandarización de reacciones de PCR	40
5.2.4.1	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada (GAPDH)	40
5.2.4.2	Adiponectina (ADQ)	41
5.2.4.3	Receptor 1 de adiponectina (ADR1)	41
5.2.4.4	Receptor 2 de adiponectina (ADR2)	42
5.2.5	Ensayos de PCR cualitativo y semicuantitativo	43
5.2.5.1	Adiponectina en tejido adiposo	43
5.2.5.2	Adiponectina en CMN de grupos de estudio y controles sanos	44
5.2.5.3	Expresión cualitativa de los receptores 1 y 2 de adiponectina en tejido adiposo humano	47
5.2.5.4	Expresión cualitativa de los receptores 1 y 2 de adiponectina en CMN	48
5.2.6	Expresión cualitativa de los receptores 1 y 2 de adiponectina en los diferentes grupos de estudio	49

5.2.7 Determinación de la expresión semicuantitativa de ADR1 y ADR2 en CMN.....	52
5.2.8. Datos obtenidos de la expresión de ADR1 y ADR2 en los grupos de estudio.....	54
5.2.9 Determinación de los niveles séricos de adipocinas, factores virales y parámetros bioquímicos en sujetos VHC vs. grupos control.....	57
5.2.10 Comparación de las variables antropométricas, bioquímicas y virales entre los grupos VHC y controles sanos.....	59
5.2.11 Comparación de las variables antropométricas, bioquímicas y virales entre los grupos VHC y controles hepatópatas.....	61
5.2.12 Correlación de niveles plasmáticos de las adipocinas y expresión de los mRNA´s de las adipocinas y sus receptores, con los parámetros clínicos, bioquímicos y virológicos en los grupos de estudio.....	62
<b>CAPITULO VI. DISCUSION.....</b>	<b>65</b>
<b>CAPITULO VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>CAPITULO VIII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>70</b>
<b>CAPITULO IX. REFERENCIAS .....</b>	<b>71</b>



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>FIGURA.</b>	<b>PAGINA.</b>
1. Estructura del VHC. ....	3
2. Estructura genómica del VHC.....	4
3. Isoformas de la adiponectina.....	14
4. Receptores ADR1 y ADR2.....	15
5. Estandarización de las condiciones de amplificación de los fragmentos de adiponectina y sus receptores.....	19
6. Captación de pacientes, datos demográficos, obtención de CMN de SP, análisis de expresión y análisis estadístico.....	19
7. Equipo Vitros DT60II y sus módulos.....	30
8. Equipo IMx de Abbott.....	32
9. ELISA tipo sándwich.....	33
10. Análisis de RNA total .....	39
11. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mRNA de GAPDH.....	40
12. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mRNA de ADQ.....	41
13. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mRNA de ADR1.....	41
14. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mRNA de ADR1.....	42
15. Producto amplificado de adiponectina (85pb) a distintas temperaturas de alineamiento.....	43
16. Análisis de adiponectina en gel de agarosa en sujetos sanos.....	44
17. Expresión de ADQ en pacientes con esteatosis, EHNA o VHC. ....	45
18. Expresión de ADQ en pacientes con VHC.....	45
19. Expresión de ADQ en pacientes con HAI y cirrosis criptogénica .....	46
20. Expresión cualitativa de ADR1 y ADR2 en cDNA de tejido adiposo humano.....	47
21. Expresión cualitativa de ADR1 y ADR2 en cDNA de CMN humanas.....	48
22. Expresión de GAPDH, ADR1 y ADR2 .....	49
23. Expresión de ADR1 y ADR2 en sujetos del grupo con infección por VHC.....	49
24. Expresión de ADR1 y ADR2 en sujetos del grupo control sano.....	50
25. Expresión de ADR1 y ADR2 en sujetos del grupo con HAI .....	50

26. Expresión de ADR1 y ADR2 en hepatitis criptogénica , EHNA y HAI .....	51
27. Expresión de ADR1 y ADR2 en sujetos VHC.....	51
28. Análisis semicuantitativo in sílico de ADR1 y ADR2 .....	52
29. Análisis de amplicones de ADR1 , ADR2 y GAPDH.....	53
30. Datos comparativos de la expresión de ADR1 y ADR2 en los grupos de estudio.....	56
31. Comparación de los niveles séricos de ADQ entre los grupos de estudio.....	57
32. Comparación de niveles de leptina sérica entre los grupos de estudio.....	58

## LISTA DE TABLAS.

---

<b>TABLA.</b>	<b>PAGINA.</b>
1. Expresión semicuantitativa de ADR1 y ADR2 en el grupo VHC.....	54
2. Expresión semicuantitativa de ADR1 y ADR2 en el grupo control sano .....	54
3. Expresión semicuantitativa de ADR1 y ADR2 en el grupo control hepatópata .....	55
4. Datos comparativos de la expresión de ADR1 y ADR2 en los grupos de estudio.....	56
5. Comparación de adipocinas entre los grupos de estudio.....	57
6. Comparación de niveles de leptina sérica entre los grupos de estudio.....	58
7. Variables demográficas, antropométricas, bioquímicas y virales para los grupos VHC y controles sanos.....	59
8. Comparación de variables bioquímicas para los grupos VHC y controles sanos.....	60
9. Comparación de variables demográficas, antropométricas, bioquímicas y virales entre los grupos VHC y controles hepatópatas .....	61
10. Comparación de variables bioquímicas de los grupos VHC y controles hepatópatas.....	61
11. Correlaciones de Leptina, adiponectina y sus receptores para el grupo de sujetos con VHC.....	62
12. Correlación de Leptina, adiponectina y sus receptores con los parámetros antropométricos y bioquímicos en el grupo con VHC .....	62
13. Correlación de Leptina, adiponectina y sus receptores con los parámetros metabólicos en el grupo con VHC .....	63
14. Correlación de Leptina, adiponectina y sus receptores con el perfil de lípidos y carga viral en el grupo con VHC .....	63
15. Correlaciones estadísticamente significativas presentes en entre los grupos de estudio.....	64
16. Análisis de regresión lineal univariado y multivariado en el grupo VHC con carga viral positiva.....	64

## NOMENCLATURA

---

<b>μl</b>	<b>Microlítros</b>
<b>°C</b>	<b>Grados Celsius (o centígrados)</b>
<b>aa.</b>	<b>Aminoácido(s)</b>
<b>ADQ</b>	<b>Adiponectina</b>
<b>ADR1 ó AdipoR1</b>	<b>Receptor 1 de la adiponectina</b>
<b>ADR2 ó AdipoR2</b>	<b>Receptor 2 de la adiponectina</b>
<b>ALB</b>	<b>Albúmina</b>
<b>ALKP</b>	<b>Fosfatasa alcalina</b>
<b>ALT</b>	<b>Alaninoamino transferasa</b>
<b>AST</b>	<b>Aspartatoaminotransferasa</b>
<b>cDNA</b>	<b>DNA complementario</b>
<b>CHC</b>	<b>Carcinoma hepatocelular</b>
<b>CMN de SP</b>	<b>Células mononucleares de sangre periférica</b>
<b>CMN</b>	<b>Células mononucleares</b>
<b>COL</b>	<b>Colesterol total</b>
<b>D.O.</b>	<b>Densidad óptica</b>
<b>DE</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>DEPC</b>	<b>Dietil-policarbonato</b>
<b>dl</b>	<b>decilitro</b>
<b>DNA</b>	<b>Acido desoxirribonucléico</b>

<b>dsDNA</b>	<b>DNA de cadena doble</b>
<b>EC</b>	<b>Hepatopatía de etiología criptogénica</b>
<b>EHGNA</b>	<b>Enfermedades de hígado graso No-Alcohólico</b>
<b>EHNA</b>	<b>Esteatosis hepática no alcohólica</b>
<b>ELISA</b>	<b>Inmunoensayo ligado a enzima</b>
<b>GAPDH</b>	<b>Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa</b>
<b>GGT</b>	<b>Gammaglutamil transferasa</b>
<b>GLU</b>	<b>Glucosa sérica</b>
<b>H2SO4</b>	<b>Ácido Sulfúrico</b>
<b>HA</b>	<b>Hepatitis Alcohólica</b>
<b>HAI</b>	<b>Hepatitis Autoinmune</b>
<b>HDLc</b>	<b>Colesterol HDL</b>
<b>HE</b>	<b>Hepatopatía por esteatosis</b>
<b>HOMA</b>	<b>Modelo de evaluación de homeostasis (Homeostasis model assesment)</b>
<b>HVR1</b>	<b>Región hipervariable 1 del VHC</b>
<b>ICC</b>	<b>Índice cintura-cadera</b>
<b>IMC</b>	<b>Índice de masa corporal</b>
<b>IR</b>	<b>Resistencia a Insulina</b>
<b>IRES</b>	<b>Sitio Interno de entrada al ribosoma</b>
<b>ITCG</b>	<b>Isotiocianato de Guanidina</b>
<b>LDH</b>	<b>Lactato deshidrogenasa</b>
<b>LDL</b>	<b>Lipoproteínas de baja densidad</b>
<b>LEP</b>	<b>Leptina</b>

<b>MEIA</b>	<b>Enzimoimmunoanálisis de micropartícula</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Cloruro de magnesio</b>
<b>min.</b>	<b>minuto(s)</b>
<b>ml</b>	<b>mililitros</b>
<b>mm<sup>3</sup></b>	<b>Milímetros cúbicos</b>
<b>MMLV-RT</b>	<b>Enzima transcriptasa reversa del virus de leucemia murina de Maloney.</b>
<b>mmol</b>	<b>milimoles</b>
<b>mRNA</b>	<b>RNA mensajero</b>
<b>ng</b>	<b>nanogramos</b>
<b>ng/μl</b>	<b>nanogramos por microlitro</b>
<b>nm</b>	<b>nanómetros</b>
<b>nt</b>	<b>nucleótido</b>
<b>ORF</b>	<b>Marco de lectura abierta (Open reading frame)</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>
<b>pg</b>	<b>picogramos</b>
<b>PT</b>	<b>Proteínas totales</b>
<b>RNA</b>	<b>Acido Ribonucleico</b>
<b>RNA´s IN</b>	<b>Inhibidor de RNAsas</b>
<b>RNAsas</b>	<b>Enzimas que degradan RNA</b>
<b>RNase OUT</b>	<b>Inhibidor de RNAsas</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RT</b>	<b>Reacción de retrotranscripción</b>

<b>RVS</b>	<b>Respuesta virológica sostenida</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema Nervioso Central</b>
<b>ssDNA</b>	<b>DNA de cadena sencilla</b>
<b>TBil</b>	<b>Bilirrubinas totales</b>
<b>Tm</b>	<b>Temperatura de alineamiento</b>
<b>TRIG</b>	<b>Triglicéridos</b>
<b>UI</b>	<b>Unidades internacionales</b>
<b>UTR</b>	<b>Región No Traducida (Untranslated Region)</b>
<b>V</b>	<b>Unidad de voltaje (Voltios)</b>
<b>VHB</b>	<b>Virus de la hepatitis B</b>
<b>VHC</b>	<b>Virus De la Hepatitis C.</b>
<b>VLDL</b>	<b>Lipoproteínas de muy baja densidad VLDL</b>
<b>X</b>	<b>Veces la concentración</b>

## ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA, ADIPONECTINA Y SUS RECEPTORES EN PACIENTES CON HEPATITIS C.

Ríos Guerra M.A., Cordero Pérez P., Muñoz Espinosa L.E. y Rivas Estilla A.M., Unidad de Hígado y Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina de la UANL.

### Introducción:

La hepatitis C (HC) es la primera causa de morbi-mortalidad relacionada al hígado. Se ha descrito que niveles elevados de leptina (Lep) sérica en HC así como los niveles plasmáticos de adiponectina (ADQ) correlacionan inversamente con la esteatosis en HC.

**Objetivo.** Evaluar si existe asociación entre la expresión de ADQ, sus receptores y Lep en células mononucleares (CMN) de sangre periférica con las características bioquímicas, clínicas y virológicas de pacientes con HC.

**Material y métodos:** Se incluyeron tres grupos de estudio: 1) Pacientes con infección por VHC (gVHC)(n=38, 14M y 24F), 2) Pacientes con diversas hepatopatías (gCH) (n=34, 13M y 21F), y 3) Grupo control sano (gCS) (n=27, 10M y 17F). Se determinó la expresión de los mRNA de ADQ, ADR1 y ADR2 en CMN mediante RT-PCR, así como los niveles plasmáticos de ADQ y Lep por ELISA. Se evaluaron los parámetros clínicos, bioquímicos y virológicos en los grupos de estudio.

**Resultados:** No se encontró expresión del mRNA de ADQ en los grupos de estudio. El mRNA de ADR1 fué: gVHC Vs gCS:  $3.25 \pm 2.91$  Vs  $2.25 \pm 1.79$  ( $p=0.387$ ), gVHC Vs gCH:  $3.25 \pm 2.91$  Vs  $1.60 \pm 1.05$  ( $P=0.037$ ). El mRNA de ADR2 fué: gVHC Vs gCS:  $2.56 \pm 1.96$  Vs  $1.67 \pm 1.31$  ( $p=0.067$ ), gVHC Vs gCH:  $2.56 \pm 1.96$  Vs  $1.22 \pm 0.89$  ( $p < 0.0001$ ). Los valores de ADQ (ug/mL) fueron: gVHC Vs gCS:  $47.0 \pm 7.92$  Vs  $15.2 \pm 6.1$  ( $p < 0.0001$ ), gVHC Vs gCH:  $47.0 \pm 7.92$  Vs  $47.0 \pm 7.92$  Vs  $53.10 \pm 13.4$  ( $p < 0.0001$ ) y de Lep (ng/ml) fueron: gVHC Vs gCS:  $2.76 \pm 4.26$  Vs  $0.30 \pm 0.54$  ( $p=0.085$ ), gVHC Vs gCH:  $2.76 \pm 4.26$  Vs  $6.28 \pm 6.39$  ( $p=0.005$ ). Con respecto a los parámetros antropométricos, bioquímicos y virales entre gVHC y gCS se encontró diferencia en: Peso ( $P=0.012$ ), IMC ( $P=0.001$ ), ICC ( $P=0.013$ ), HOMA IR, QUICKI, Insulina, AST, ALT, ALP, GGT, Colesterol, Triglicéridos, VLDL y LDL ( $P < 0.0001$ ), LDH ( $P=0.009$ ), HDL ( $P=0.002$ ). Y en gVHC Vs gCH diferencias en: Edad ( $P=0.024$ ) y AST ( $P=0.02$ ). En gVHC se encontró correlación entre ADQ y Lep. ( $R=0.406$ ,  $P=0.012$ ), mRNA ADR1 y mRNA ADR2 ( $R=0.795$ ,  $P < 0.001$ ), peso y Lep ( $R=0.504$ ,  $p=0.001$ ), IMC y Lep ( $R=0.612$ ,  $p < 0.001$ ), e insulina y Lep ( $R=0.320$ ,  $p=0.049$ ).

**Conclusiones:** No se encontró expresión del mRNA de ADQ en CMN en ninguno de los grupos estudio. ADR1 y ADR2 mostraron una expresión relativamente mayor en gVHC respecto a gCH y gCS. La ADQ y Lep fueron mayores en gVHC respecto al gCS, pero menores respecto al gCH. Los índices de HOMA IR y QUICKI mostraron una resistencia mayor a la insulina en el grupo VHC respecto al grupo control sano. La leptina correlacionó con ALT e IMC en sujetos VHC con carga viral positiva. ADR1 y ADR2 mostraron una correlación en los 3 grupos de estudio, mostrando a su vez una correlación en los sujetos VHC con carga viral positiva mediante análisis multivariado. Nuestros resultados sugieren que la presencia del VHC induce una mayor expresión de los receptores ADR1 y ADR2 en CMN, así como de niveles séricos más altos de adiponectina y leptina en estos sujetos. Sin embargo se sugieren más estudios para establecer la participación de estos receptores y adipocinas en la patogénesis del VHC. Proyecto apoyado por PAICYT 2006 SA1467-06.

NUMERO DE PÁGINAS: 73



## **CAPITULO I**

---

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Definición de Hepatitis C.**

La hepatitis C es una enfermedad viral que afecta el hígado, causando su inflamación. Es producida por el VHC (virus de la hepatitis C), que es un virus de gran interés médico ya que la infección con este agente, esencialmente transmitido por sangre, es una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC), con un número estimado en 200 millones de personas infectadas mundialmente (aprox. 3% de la población) (Alter y cols., 1999). La mayoría de las personas infectadas (70 al 80%) evolucionan a cronicidad, desarrollándose en muchos casos la cirrosis hepática y el CHC (Di Bisceglie, 1997, Blum, 1994). Desde su clonación, hace poco más de 16 años, numerosos esfuerzos en investigación han permitido elucidar la organización genómica de este agente infeccioso y definir las funciones de las proteínas que lo forman (Choo y cols., 1989).

##### **1.1.1 El VHC en México.**

Por lo menos seis estudios efectuados en México analizan la prevalencia del VHC (Guerrero Romero y cols. 1996, Hernández Pérez y cols. 1994, Sánchez Morral y cols. 1994, Méndez Sánchez y cols. 1999, Álvarez Muñoz y cols. 2001, Redlinger TE y cols. 2001). Tres de ellos se realizaron en donadores de sangre, uno en población obstétrica y uno más en pacientes post-transfusión. La prevalencia de anticuerpos contra el VHC en donadores de sangre fue del 1.47, 0.74 y 0.61%, respectivamente, en la población

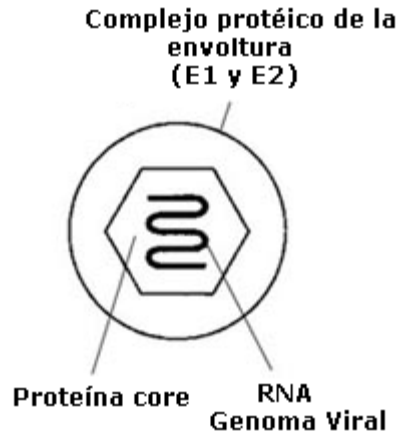
obstétrica fue de 2%, y por último, en pacientes post-transfusión fue de 2% (Guerrero Romero y cols. 1996, Hernández Pérez y cols. 1994, Sánchez Morral y cols. 1994, Méndez Sánchez y cols. 1999, Álvarez Muñoz y cols.2001, Redlinger TE y cols. 2001). Los factores de riesgo vinculados con la seroprevalencia fueron el antecedente de transfusión y la promiscuidad sexual.

En términos generales puede decirse que la infección por VHC en México es frecuente; con base en el promedio de diferentes cifras de los estudios antes mencionados asciende a 1.2%. De acuerdo con el censo de población (  $\approx$  100 millones) podría inferirse que en la actualidad existen alrededor de 1,200,000 personas infectadas en nuestro país. (Uribe and Méndez-Sánchez 2002)

## **1.2 Agente Etiológico de la Hepatitis C**

### **1.2.1 Estructura del VHC.**

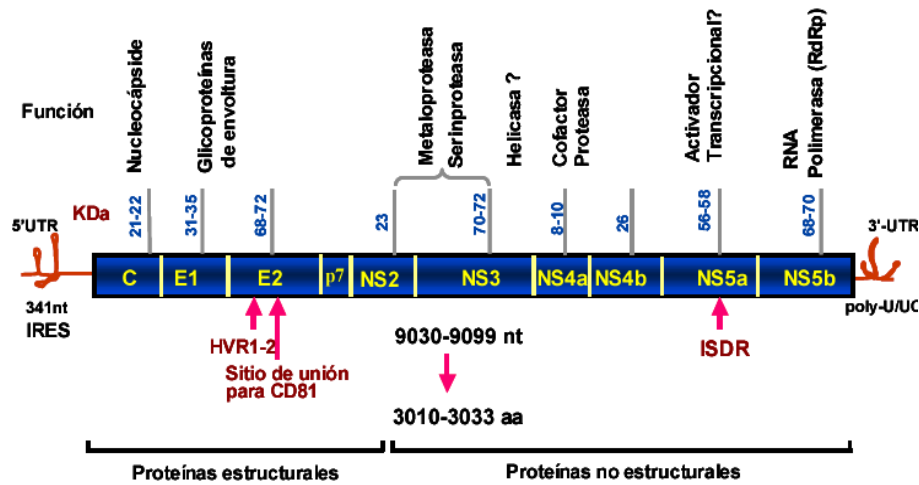
El virus de la hepatitis C (VCH) es un virus RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, único miembro del género Hepacivirus y perteneciente a la familia Flaviviridae (Ohba K y cols. 1996, Robertson B. y cols. 1998, Linden J. y cols. 1996). Este virus se caracterizó mediante membranas de policarbonato usadas para bloquear el paso de bacterias, determinando un tamaño para éste virus de aproximadamente 50 nm de diámetro. La infectividad de este virus se eliminó mediante tratamiento con cloroformo, por lo que se asumió que tenía envoltura lipídica (He y cols. 1987).



**Figura 1.** Estructura del VHC. Partícula de aproximadamente 50 nm.

Su genoma es de aproximadamente 9,400 nucleótidos y está flanqueado en ambos extremos por regiones no traducidas (UTR's). La primera de estas regiones es la 5'-UTR, localizada al inicio de la secuencia nucleotídica, y la segunda es la 3'-UTR, localizada al extremo final del genoma (Bartenschlager RF y cols. 2000). Estas dos regiones poseen secuencias nucleotídicas altamente conservadas y señales requeridas para marcar el inicio y el final en la replicación ciclo de este virus. Ambas regiones UTR flanquean la secuencia nucleotídica de este virus, la cual codifica para un solo marco de lectura abierta (ORF) (Bartenschlager RF y cols. 2000).

## Virus de la Hepatitis C



**Figura 2.** Estructura genómica del VHC.

Dentro de la región 5'-UTR (nt. 44 - 354) se encuentra una zona conocida como sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), la cual se une directamente al ribosoma para iniciar la traducción del mensaje nucleotídico contenido en la hebra de RNA (Pestota TV y cols. 2001). Dicha región permite el inicio de la producción de las proteínas virales, pasando por alto los mecanismos estándar de traducción usados por la célula infectada para producir sus propias proteínas celulares. (Pestota TV y cols. 1996, Pestota TV y cols. 2001).

El RNA del VHC codifica para una poliproteína de 3010 a 3033 aa. En las células infectadas, esta poliproteína es cortada por proteasas celulares y virales para producir 10 diferentes polipéptidos que conforman las proteínas estructurales (core, E1, E2 y p7) y las no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b). (Grakoui A, McCourt DW y cols 1993, Grakoui A, Wychowski C y cols. 1993).

La proteína core (C) posee una secuencia de aminoácidos altamente conservada y se le ha adjudicado un papel importante en la formación de la nucleocápside (Rosenberg S. y cols 2001). El VHC es diferente y algo inusual para ser un virus RNA, ya que es capaz de establecer infecciones persistentes en la mayoría de los individuos expuestos. (Simmonds 2004).

### **1.2.2. Sitios de replicación del VHC**

Aunque el mecanismo de replicación del VHC no está totalmente entendido, se asume que la replicación involucra la síntesis de una cadena negativa de RNA que sirve de templado para la producción de la cadena positiva o RNA genómico del VHC (Clarke 1997) . Así, la detección de la cadena negativa del VHC es indicativa de replicación viral. El hígado es el sitio principal de replicación del VHC, pero también puede replicarse en sitios extrahepáticos tales como células mononucleares de sangre periférica (CMN) (Wang, Sheu et al. 1992; Manzin, Candela et al. 1994; Saleh, Tibbs et al. 1994; Chang, Young et al. 1996). Referente a la infección en CMN de SP se ha mostrado que el VHC puede propagarse en cultivos de células linfoides y que el virus derivado de éstas puede ser infeccioso (Shimizu, Iwamoto et al. 1992; Shimizu, Igarashi et al. 1998).

### **1.2.3. Clasificación del VHC.**

Como en el caso de otros virus RNA, el VHC posee alta heterogeneidad genética. La tasa de mutación estimada del VHC en el organismo humano es de  $1.92 \times 10^3$  nucleótidos  $\cdot^{-1}$  año $^{-1}$ . Esta diversidad genética no es distribuida eventualmente en el genoma viral. Las regiones no codificantes son relativamente conservadas, mientras que las regiones de la envoltura, especialmente HVR1, poseen el índice mayor de mutación. (Lyra, Fan et al. 2004). Comparaciones en las secuencias nucleotídicas de variantes extraídas de individuos infectados en diferentes grupos de riesgo y de diferentes regiones geográficas reveló la existencia de al menos 6 grupos genéticos mayores o genotipos (1 al 6) (Simmonds 2004) y muchos subtipos, basado en el análisis de la región NS5. Diferentes genotipos pueden diferir del 30 al 35% en la secuencia del genoma, mientras que los subtipos, más cercanamente relacionados, pueden diferir del 20-25%. (Lyra, Fan et al. 2004; Simmonds 2004).

Durante el curso de la infección crónica por VHC en un individuo, ocurren mecanismos adaptativos en el genoma del VHC que generan cambios nucleotídicos acumulativos a través del tiempo y grados variables de diversidad en la secuencia de la población replicante, generándose cuasiespecies del VHC, que difieren ligeramente en la secuencia nucleotídica, debido a la poca fidelidad de replicación de la RNA polimerasa dependiente de RNA del VHC (Bukh J. y cols, 1995, Simmonds 2004). La infección así mismo puede ser mixta, encontrándose uno o más genotipos o subtipos del VHC en un individuo (Jonsson, Moschen et al. 2005).

#### **1.2.4 Implicación clínica del genotipo de VHC.**

Diversos estudios han sugerido que el genotipo 1b del VHC puede estar asociado con mayor severidad en enfermedad hepática que otros genotipos, incluyendo el desarrollo de carcinoma hepatocelular. Sin embargo, otros investigadores no han confirmado estos datos, y este hecho permanece no resuelto. Por otro lado, está bien establecido que los pacientes infectados con hepatitis crónica genotipo 1 responden menos favorablemente a la terapia con interferón o interferón pegilado solo o en combinación con ribavirina comparando con pacientes infectados con genotipos 2 o 3 del VHC (Lyra, Fan et al. 2004).

#### **1.2.5 El VHC y su relación con esteatosis y síndrome metabólico.**

La progresión usual de la enfermedad hepática en pacientes con hepatitis C es un proceso de inflamación acompañado por necrosis periportal y fibrosis. La inflamación que resulta de la infección viral causa estimulación de células estelares las que al final llevan al depósito de colágeno que conduce a la progresión de fibrosis en el hígado. Si este proceso es rápido y constante el término común es el desarrollo de cirrosis la cual es la etapa final irreversible caracterizada por nódulos de parénquima con rodeado por septos fibrosos (Poynard, Bedossa et al. 1997). Se considera que el VHC no daña directamente el hígado pero si que activa una linfoproliferación específica al VHC. A través de producción profusa de citocinas y del efecto citopático directo, estas células causan la apoptosis del hepatocito (Poynard, Bedossa et al. 1997).

Muchos pacientes con hepatitis C crónica también presentan algún grado de esteatosis en biopsia hepática. La esteatosis hepática, definida como una excesiva acumulación de

lípidos en el citoplasma de los hepatocitos, se ha identificado como una significativa causa de cirrosis (Brunt 2001).

Hay dos formas de esteatosis presente en pacientes con hepatitis C, a saber la esteatosis metabólica y la esteatosis inducida por el VHC. La esteatosis metabólica es un proceso que ocurre en la condición de obesidad, hiperlipidemia y resistencia a insulina (Scheen AJ y cols. 2003, Marchesini G y cols. 2003). Esta forma de esteatosis es también parecida al tipo de infiltración grasa que ocurre por el consumo excesivo de alcohol. La esteatosis metabólica no es activada en alguna forma por el VHC sin embargo la combinación de esta forma de esteatosis y la presencia de VHC ha sido asociado a una progresión más rápida a fibrosis (Johan Westin y cols. 2002, Cholet y cols. 2004). El otro tipo de esteatosis hallada en pacientes con VHC es infiltración de grasa directamente causada por el virus. Aunque el mecanismo preciso se desconoce, la esteatosis inducida por el VHC es reconocida como la ruta única para un efecto citopático directo.(Yoon and Hu 2006).



### **1.2.5.1 Esteatosis Metabólica.**

La etiología de esteatosis hepática puede determinarse por la distribución y tamaño de la acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos. La esteatosis macrovesicular vista en el síndrome de Reye y la enfermedad aguda de hígado graso en el embarazo ocurre debido a un mal funcionamiento en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos libres y esto puede causar falla hepática aguda. (Yoon and Hu 2006).

Por otro lado, la esteatosis macrovesicular es el hallazgo histológico en pacientes con enfermedades de hígado graso no-alcohólico (EHGNA). Esta última se caracteriza por un cambio grueso macrovesicular con inflamación lobular o portal en ausencia de un historial significativo de uso de alcohol. Las EHGNA ocurren en la condición de obesidad, hiperlipidemia y diabetes, lo que se conoce como un síndrome metabólico. (Clarke 1997)

El síndrome metabólico (conocido también como síndrome de resistencia a insulina o síndrome de obesidad y dislipidemia) consiste de obesidad abdominal llevando a resistencia a insulina, hipertensión e hipertrigliceridemia, y es reconocido como predisposición mayor a esteatosis. (Marchesini, Bugianesi et al. 2003; Scheen and Luyckx 2003). La teoría más apoyada reconoce a la resistencia a la insulina como el mecanismo más importante en la patogénesis de la esteatosis hepática. (Marchesini, Brizi et al. 1999; Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001; Willner, Waters et al. 2001; Chitturi, Abeygunasekera et al. 2002; Pagano, Pacini et al. 2002) En un reporte de 1990 de 22 autopsias confirmadas histológicamente para enfermedad de hígado graso, se encontró que 20 pertenecían a pacientes obesos y con diabetes mellitus. (Wanless and Lentz 1990).

La presunción de que hay una relación causal entre el síndrome metabólico y la progresión de la enfermedad en hepatitis C tiene sentido dada la conexión entre esteatosis y la actividad necroinflamatoria en pacientes con VHC. (Adinolfi, Gambardella et al. 2001; Jonsson, Moschen et al. 2005).

Estudios previos han indicado que la obesidad es un factor de riesgo independiente de valores de ALT elevados que predicen progresión de fibrosis. Un estudio en España encontró una gran proporción de progresores rápidos y una baja proporción de progresores lentos en pacientes con IMC mayor a 30kg/m<sup>2</sup>.(Ortiz, Berenguer et al. 2002)

Los pacientes con síndrome metabólico tienen algún grado de resistencia a insulina. La diabetes fue considerada ser un malestar secundario a la falta de producción de insulina pero se conoce hoy como un padecimiento de resistencia a insulina y una resultante hiperinsulinemia (Nolan, Ludvik et al. 1994; Bailey and Turner 1996).

#### **1.2.5.2 Esteatosis inducida por el VHC.**

La presencia de esteatosis en biopsia hepática de pacientes con hepatitis C es más frecuente comparando contra otras enfermedades crónicas como hepatitis B o hepatitis autoinmune.(Hwang, Luo et al. 2001). La esteatosis es también 2.5 veces más prevalente en pacientes con hepatitis C que en la población general (Lonardo, Adinolfi et al. 2004).

La esteatosis macrovesicular presente en pacientes con VHC está también distribuida en áreas periportales en vez de la región centrilobular lo cual es más común en EHGNA. (Zaitoun, Al Mardini et al. 2001). Se ha mostrado que el genotipo 3 del VHC está independientemente asociado con esteatosis hepatocelular en pacientes con hepatitis crónica. (Rubbia-Brandt, Quadri et al. 2000). Además, la severidad de la esteatosis en

estos pacientes está directamente relacionada a la carga viral del VHC. Esta relación y la magnitud de esteatosis no se observó en otros genotipos de VHC (Hezode, Roudot-Thoraval et al. 2004).

Se ha visto también que la esteatosis que estaba inicialmente en pacientes con genotipo 3 revertía luego de una respuesta virológica sostenida (RVS) alcanzada por tratamiento con interferón pegilado y ribavirina (Patton, Patel et al. 2004). La esteatosis no solo desaparece con la erradicación del virus sino que también recurre si hay recaída (presencia del virus luego de RVS). Todos estos hallazgos se observaron solo en genotipo 3 de VHC y no fue reproducible en otros genotipos. Esto señala la habilidad del VHC genotipo 3 de inducir esteatosis, aunque el mecanismo no es entendido aún.

Así, parece haber dos formas distintas de esteatosis en pacientes con hepatitis C crónica. La esteatosis metabólica generalmente ocurre con todos los genotipos de VHC y probablemente empeora la progresión de la fibrosis inducida por VHC. Entonces hay pacientes con genotipo 3 que tienen una forma de esteatosis que es directamente inducida por el VHC y que revierte con tratamiento exitoso. Estas dos formas de esteatosis pueden coexistir en pacientes con genotipo 3 con otras enfermedades metabólicas (Yoon and Hu 2006).

### **1.2.6 Regulación del metabolismo por adipocinas y su relación al síndrome metabólico.**

La visión del tejido adiposo como un almacén pasivo de energía ha cambiado y hoy es bien sabido que expresa diversos péptidos bio-activos, conocidos como adipocinas, que actúan de manera autócrina y parácrina tanto local como sistémicamente (Grundy,

Brewer et al. 2004). En 1994 con la identificación y caracterización de la leptina se caracterizó al tejido adiposo como un órgano endócrino (Zhang, Proenca et al. 1994). Adicionalmente a estas señales eferentes, el tejido adiposo expresa numerosos receptores que le permiten responder a señales aferentes de sistemas hormonales tradicionales tanto como al sistema nervioso central (Kershaw and Flier 2004). A través de esta red interactiva, el tejido adiposo está involucrado integralmente en coordinar diversos procesos biológicos incluyendo metabolismo energético, función neuroendócrina y función inmune (Kershaw and Flier 2004). La función endócrina del tejido adiposo es enfatizada por las consecuencias metabólicas adversas de su deficiencia o exceso (Grundy, Brewer et al. 2004). Las funciones endócrinas del tejido adiposo caen en 2 categorías: 1) proteínas secretadas que ejercen efectos metabólicos en células o tejidos distantes, y 2) enzimas involucradas en el metabolismo de hormonas esteroideas. (Kershaw and Flier 2004). La obesidad o exceso de tejido adiposo, particularmente en el compartimiento visceral, está asociado a resistencia a insulina, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensión, y estados protrombóticos y proinflamatorios. La prevalencia de obesidad y estas enfermedades asociadas, conocidas como síndrome metabólico, ha alcanzado proporciones epidémicas (Grundy, Brewer et al. 2004).

#### **1.2.6.1 Leptina**

La leptina (del griego *leptos*, que significa delgado) es un polipéptido de 16 KDa con 167 aa con homología estructural a las citocinas. Los adipocitos secretan leptina tanto en proporción a la masa de tejido adiposo como al estado nutricional, y esta secreción es

mayor en tejido adiposo subcutáneo que en tejido adiposo visceral. (Wajchenberg 2000; Fain, Madan et al. 2004).

Los receptores de leptina son miembros de la superfamilia de receptores de citocinas y son expresados tanto en el SNC y en la periferia. Aunque se han reportado diversas variantes del receptor de leptina, la forma larga medía la mayoría de los innumerables efectos de la leptina (Bjorbaek and Kahn 2004).

Los efectos de la leptina en la homeostasis energética están bien documentados (Friedman and Halaas 1998). Muchos de estos efectos, particularmente en la toma y gasto de energía, son mediados por vías hipotalámicas, mientras que otros lo hacen mediante acción directa en tejidos periféricos, incluyendo músculo y las células  $\beta$ -pancreáticas (Bjorbaek and Kahn 2004).

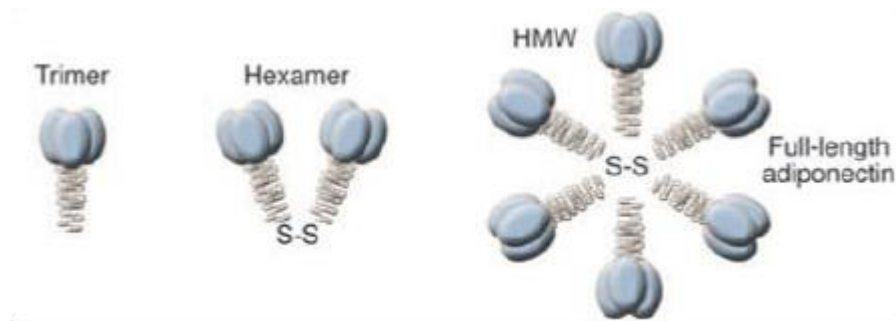
Otros efectos endócrinos diversos de la leptina incluyen la regulación de la función inmune, hematopoyesis, angiogénesis y desarrollo óseo. Además normaliza la función inmune suprimida asociada a desnutrición y deficiencia de leptina (Lord, Matarese et al. 1998). También promueve la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, altera la producción de citocinas de las células inmunes, estimula el crecimiento celular endotelial, y acelera la cura de heridas (Margetic, Gazzola et al. 2002).

#### **1.2.6.2 Adiponectina.**

La adiponectina es un polipéptido de aproximadamente 30kDa que contiene en su secuencia amino terminal un dominio variable, un dominio tipo colágena y un dominio globular carboxilo terminal. En 1995 la adiponectina fue caracterizada independientemente por 4 grupos de investigadores, debido a esto es conocida con

nombres alternativos como apM1 (transcripto adiposo 1 más abundante), Acrp30 (proteína relacionada a complemento de 30kDa), adipoQ y GBP28 (gelatin binding protein , 28kDa) (Scherer, Williams et al. 1995; Hu, Liang et al. 1996; Maeda, Okubo et al. 1996; Nakano, Tobe et al. 1996). Es altamente expresada de manera específica en adipocitos diferenciados y circula en altos niveles en la sangre. La adiponectina sufre procesos de modificación post traduccional como reacciones de hidroxilación y glicosilación que producen distintas isoformas, las cuales se ensamblan luego en trímeros y luego en estructuras oligoméricas de orden mayor.

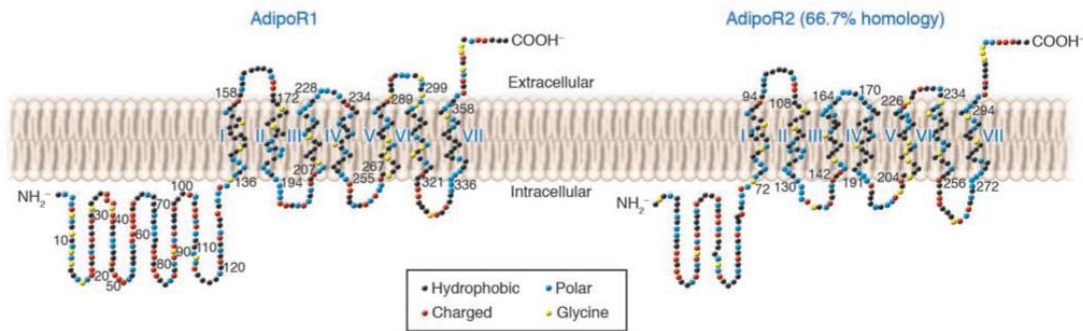
**Figura 3.** Isoformas de la adiponectina.



También circula en sangre en niveles significativos el dominio globular de la adiponectina, producto de un rompimiento proteolítico, y posee actividad biológica (Chandran, Phillips et al. 2003).

Se han identificado dos receptores de la adiponectina (Yamauchi, Kamon et al. 2003). Estos contienen siete dominios transmembrana y son estructural y funcionalmente distintos a los receptores acoplados de proteína G.

**Figura 4.** Receptores AdipoR1 y AdipoR2.



Structure of adiponectin receptors. AdipoR1 and AdipoR2 (66.7% amino acid identity with AdipoR1) are predicted to contain 7 transmembrane domains but are structurally and topologically distinct from GPCRs. Redrawn with permission from *Endocrine Reviews* (21); copyright 2005, The Endocrine Society.

AdipoR1 es expresado principalmente en músculo y funciona como un receptor de alta afinidad para la adiponectina globular y de baja afinidad para la forma completa de adiponectina (Yamauchi T. y cols. 2003). AdipoR2 es expresado principalmente en hígado y funciona como un receptor de afinidad intermedia para ambas formas de la adiponectina. Así, los efectos biológicos de la adiponectina dependen no solo de las concentraciones relativas y propiedades de las distintas isoformas si no también de la expresión específica de tejido de los subtipos de receptor (Yamauchi T. y cols. 2003).

Se ha establecido una asociación inversa fuerte y consistente entre adiponectina con resistencia a insulina y estados inflamatorios (Chandran, Phillips et al. 2003; Diez and Iglesias 2003). La adiponectina plasmática disminuye antes del comienzo de obesidad y resistencia a insulina en primates no humanos, sugiriendo que la adiponectinemia contribuye a la patogénesis de estas condiciones (Hotta, Funahashi et al. 2001).

Los niveles de adiponectina son bajos cuando se presenta resistencia a insulina, debido a la obesidad o lipodistrofia, y la administración de adiponectina mejora los parámetros metabólicos en estas condiciones (Chandran, Phillips et al. 2003; Diez and Iglesias 2003;

Kinlaw and Marsh 2004). Contrariamente, los niveles de adiponectina aumentan cuando la sensibilidad a insulina mejora, como ocurre luego de reducción de peso o tratamiento con drogas sensibilizantes a insulina (Chandran, Phillips et al. 2003; Diez and Iglesias 2003).



### **1.2.7 Justificación del Estudio**

Un alto porcentaje de pacientes con infección por virus de hepatitis C presentan esteatosis (50%). El desconocimiento actual de los mecanismos fisiopatológicos que generan la esteatosis en estos pacientes conlleva a la necesidad de evaluar el papel de mediadores involucrados, como la expresión de adipocinas y sus receptores, con las características virológicas, en la fisiopatogenia y evolución de esta enfermedad.

Este estudio permitirá ampliar los conocimientos en :

1. La implicación de los receptores de AdipoQ y LEP en la hepatitis crónica por VHC.
2. Si el VHC es capaz de alterar el sistema de receptores en CMN.
3. Si la expresión de éstos es diferente en sujetos con y sin replicación viral.

## **CAPITULO II**

---

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

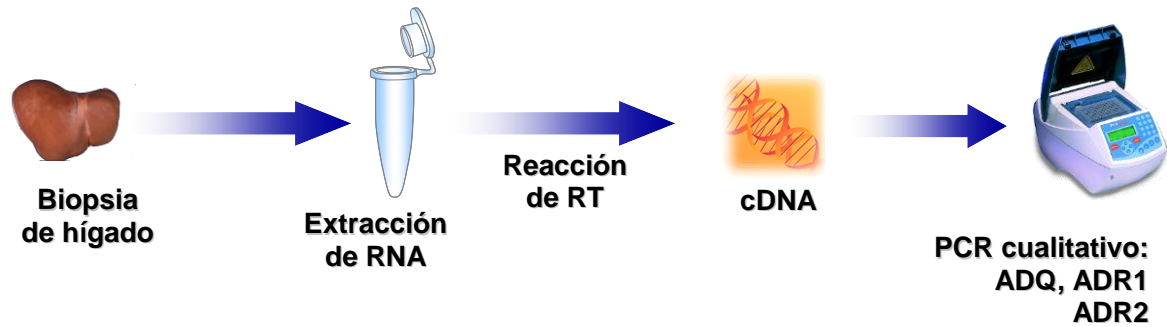
Evaluar si existe una asociación entre la expresión de adiponectina, leptina y sus receptores en células mononucleares de sangre periférica con las características bioquímicas, clínicas y virológicas de pacientes con hepatitis C.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

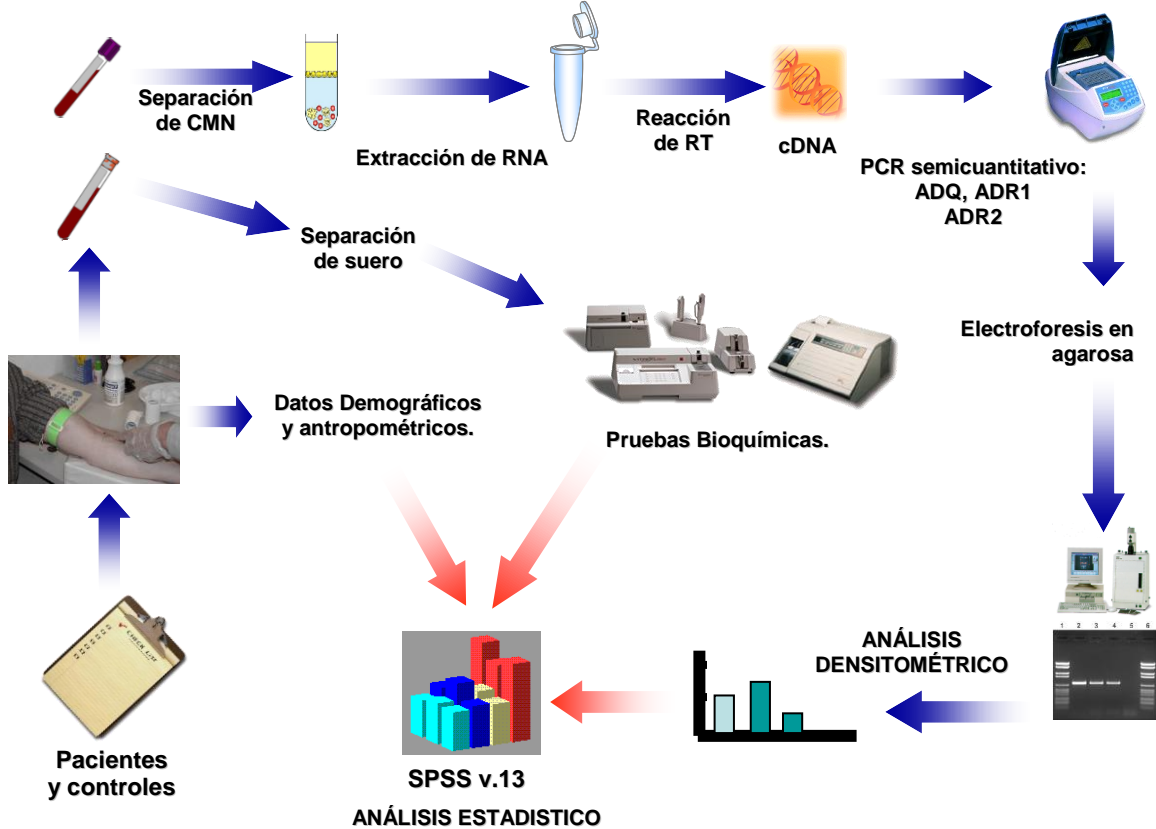
1. Evaluar la expresión de los RNAm's de adiponectina, y sus receptores en CMN de pacientes con hepatitis C Vs. grupos control.
2. Determinar los niveles plasmáticos de adiponectina, leptina, carga viral y genotipo del VHC, así como los parámetros bioquímicos en pacientes con hepatitis C Vs. Grupos control.
3. Correlacionar los niveles plasmáticos de las adipocinas (adiponectina y leptina) así como los resultados de la expresión de los RNAm's de la adiponectina y sus receptores, con los parámetros clínicos, bioquímicos y virológicos en los sujetos incluidos en el estudio.

### CAPITULO III. ESTRATEGIA GENERAL

**Figura 5.** Estandarización de las condiciones de amplificación de los fragmentos de adiponectina y sus receptores.



**Figura 6.** Captación de pacientes, datos demográficos, obtención de CMN de SP, análisis de expresión y análisis estadístico.



## **CAPITULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS.**

---

### **4.1 Sujetos incluidos en el estudio.**

Se incluyeron en el estudio pacientes que acudieron a la consulta de Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González ” durante el período de Octubre 2005- Agosto 2006.

#### **4.1.1 Criterios de inclusión generales:**

Pacientes mayores de 18 años.

Carta de consentimiento informado firmada por el paciente.

#### **4.1.2 Sujetos VHC y controles hepatópatas.**

- Pacientes con diagnóstico bioquímico y serológico de VHC.
- Pacientes con algún tipo de hepatopatías no VHC: Hepatitis autoinmune (HAI), Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), Hepatitis alcohólica (HA), Etiología criptogénica (EC).

#### **4.1.3 Controles sanos.**

Sujetos con IMC menor o igual a 25 y sin antecedentes de infección por VHC, VHB o enfermedades metabólicas.

#### **4.1.4 Criterios de exclusión:**

Pacientes coinfectados con otros virus.

Sujetos sometidos a trasplantes (renal, hepático).

Sujetos que no reúnan los criterios de inclusión de cada grupo.

#### **4.1.5 Grupos de estudio:**

4.1.5.1 **Grupo con infección crónica por VHC, (gVHC):** con diagnóstico bioquímico y serológico de infección por VHC.

4.1.5.2 **Grupo control hepatópata (gCH):** conformado por pacientes con hepatopatías no VHC (definidas en 4.1.2).

4.1.5.3 **Grupo control sano (gCS):** conformado por sujetos sanos, pareados por edad y género al grupo 1.

#### **4.2 Material**

##### **4.2.1. Origen de los reactivos**

La separación de CMN de sangre periférica se realizó empleando el método de gradiente con Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare).

La determinación de lípidos totales se realizó con un kit comercial (Hycel) que emplea el método de sulfofosfovainillina de Zolnner y Kirsch.

La determinación de enzimas hepáticas, glucosa, y perfil de lípidos se realizó empleando las laminillas de cada prueba, el equipo Vitros DT60II System Chemistry y el módulo DTSCII (Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson Co).

La determinación de insulina se realizó por un ensayo de micropartícula con el equipo IMx ( Abbott).

Las reacciones de retrotranscripción (RT) y las de PCR se realizaron empleando reactivos y enzimas de la marca Invitrogen Corp. y Epicentre Biotechnologies.

La determinación de leptina se realizó mediante el kit comercial DRG ELISA versión 5.0 ( DRG ) que es un ELISA tipo competitivo de captura y la de adiponectina se empleando el kit comercial Adiponectin sándwich ELISA kit (CHEMICON).

#### **4.2.2. Material Biológico**

Para la estandarización de las pruebas de PCR de adiponectina y sus receptores se empleó una biopsia de tejido adiposo subcutáneo humano, de la cual se realizó extracción de RNA y posterior obtención de cDNA mediante retrotranscripción. Para la obtención de células mononucleares se obtuvo sangre periférica de los sujetos de estudio y controles por la técnica de venopunción y posteriormente se separaron del paquete celular mediante centrifugación en gradiente de densidad empleando Ficoll-Paque PLUS (GE Health Care). El RNA de las CMN de sangre periférica se obtuvo mediante la técnica con Trizol (Invitrogene).

### **4.3 Equipo**

Para la realización de este trabajo se emplearon los siguientes equipos:

Cámaras de electroforesis horizontal C.B.S. Scientific CO modelo MGU-502T y fuente de poder EC Apparatus Corp. modelo EC105.

Campanas de seguridad biológica clase II Lumistell modelo LV-120 y Baker Company modelo SterilGard III Advance.

Centrífuga refrigerada Heraeus Modelo Biofugue primoR.

Centrífuga SOL-BAT. S.A. modelo J-600.

Espectrofotómetro Eppendorf modelo BioPhotometer.

Fotodocumentador de geles y software LabWorks, de UVP Biolmaging Systems.

Lector de MEIA Abbott modelo IMx.

Lector de placas ELISA (ASYS Hitech) Modelo: Expert Plus UV

Microcentrífuga Labnet modelo Spectrafugue 16M

Micropipetas automáticas de volúmenes variables marcas Rainin (modelos Pipet-lite), Corning (modelos Lambda) y Labnet.

Pipeta multicanal Labnet modelo Biopette.

Termociclador Eppendorf modelo Mastercycler Gradient.

Termociclador Applied Biosystems Modelo Gene Amp PCR System 9700.

Termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400

Lavador de placas Biotek ELX50

Vitros DT60II System Chemistry y el módulo DTSCII (Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson Co).

### Equipo de cómputo:

Procesador de texto Microsoft Office Word 2003.

### Los programas de análisis de Biología molecular fueron:

Amplify v1.0 (Hill Engels, 1992 University of Wisconsin).

Oligo v4.0 (Wojciech Rychlik, 1991).

Phoretix 1D (versión 2003.02) de Non Linear Dynamics LTD.

Vector NTI 9.0.0 (Sep.02, 2003) de Informax.

## **4.4 Métodos**

### **4.4.1 Obtención de sangre periférica de los sujetos de estudio.**

La sangre de los sujetos de estudio y controles se obtiene mediante punción venosa. Primero se invitó al paciente a tomar una postura cómoda, preferentemente sentado. Se inspeccionan sus brazos (a la altura de la vena cefálica) para buscar una vena adecuada. Una vez elegida, se frota el sitio elegido para la punción con una torunda humedecida con alcohol etílico al 70% con el fin de quitar la suciedad y el detritus epitelial, y para aumentar la cantidad de sangre en este sitio. Se coloca un torniquete apretado en la mitad del brazo, entre el codo y el hombro. Cuando la piel esté seca y se haya reanudado la circulación, se hace la punción de 2 a 3 mm con una aguja. Se hace de un solo golpe y con rapidez, pero ni tan bruscamente ni tan lejos que no se pueda acertar ni en el sitio ni la profundidad. Una punción certera duele menos que una superficial y evita la necesidad de repetir la maniobra. Se emplearán para este efecto el dispositivo BD-Vacuntainer el cual obtiene volúmenes definidos de sangre ya que los tubos presentan vacíos controlados o la jeringa con émbolo en caso necesarios.



#### **4.4.1.1 Obtención de suero y plasma en EDTA.**

Las muestras de sangre venosa obtenidas se reposaron a temperatura ambiente hasta la retracción del coágulo y posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos. Los sueros se separaron en criotubos estériles rotulados y se almacenaron a -20°C hasta su posterior empleo.

#### **4.4.2 Extracción de RNA.**

##### **4.4.2.1 Extracción de RNA total de tejido adiposo o CMN.**

Las muestras de tejido adiposo se preservaron en Trizol y almacenaron a -70°C hasta la extracción de RNA. Para la extracción se emplearon 2mm<sup>3</sup> de tejido adiposo que fueron macerados en 600 µl de trizol frío. Luego se siguió la técnica descrita en esta sección. En el caso de las CMN, ya aisladas suspendieron en 400 µl de buffer de dilución para sangre total de la técnica con Ficoll Paque PLUS (preparado según la técnica del fabricante) y se preservaron a -70°C hasta la extracción de RNA total como se describe a continuación.

La extracción de RNA se realizó de la siguiente manera: Se añadieron 600 µl de trizol y se agita en vórtex en velocidad baja. Se incubó en hielo 5 minutos. Posteriormente se añadieron 200µl de cloroformo y se agitó varias veces por inversión. Se incubó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó luego por 5 minutos a 8000 rpm a 4°C y se separó la fase acuosa, la cual se colocó en otro tubo eppendorf rotulado. Se añadieron 600 µl de isopropanol y se incubó a -20°C por 1 hora o durante la noche. Se centrifugó el tubo a 14,000 rpm por 20 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. La pastilla de RNA se lavó con 50µl de agua DEPC y se añadieron 150 µl de etanol al 100%. Se agito

posteriormente en vórtex a velocidad baja y se efectuó una centrifugación a 14,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el RNA en 20ul de agua DEPC. Se almacenó el RNA a -70°C hasta su posterior uso.

#### **4.4.2.2 Análisis electroforético del RNA**

Las soluciones necesarias para este análisis son:

**Solución de Isotiocianato de Guanidina (ITCG)** la cual es preparada con 0.059g de polvo de ITCG disueltos en 500ul de agua tratada con DEPC.

**Agua DEPC:** Agua DEPC: Esta se preparó diluyendo 1 mL de reactivo líquido de DEPC en un litro de agua bidestilada. Posteriormente se incubó a 37°C toda la noche y finalmente la solución fue esterilizada en autoclave.

**Buffer TBE 1X:** Se preparó primero una solución stock concentración 5X la cual posteriormente se diluyó a 1X. La solución stock consta de 54g de Tris Base, 27.5g de ácido bórico y 20ml de EDTA 0.5M pH=8.0 disueltos en 1L de agua destilada.

**Agarosa al 1%:** Se emplea 1 g de agarosa en polvo y se disuelve en 100ml de buffer TBE 1X. Se calienta la mezcla en horno de microondas o mechero a llama baja hasta la disolución total.

Para el análisis electroforético de RNA se empleó agarosa al 1%. Una vez preparada y tibia, se le añaden 125µl de solución de ITCG. Se mezcla bien por agitación suave y se

le agregan 2 gotas de bromuro de etidio concentrado y se agita nuevamente. La mezcla es vertida en el molde con peine y se enfría hasta solidificación. Una vez frío se retira el peine y el gel es colocado (usando guantes) en una cámara designada solamente al análisis electroforético de RNA llena con buffer TBE 1X. Las muestras son entonces inyectadas en los carriles designados previo mezclado con buffer de carga y se corren a un voltaje inicial de 70 – 80 Voltios por 10 minutos y posteriormente se incrementa el voltaje a 100V aproximadamente 1 hora o hasta que las bandas punteras del colorante hayan recorrido  $\frac{3}{4}$  partes de la distancia total del gel. Posteriormente el gel es visualizado bajo luz UV en equipo LabWorks donde es fotodocumentado y almacenado in-sílico.

#### **4.4.2.3 Reacción de Retrotranscripción (RT) para la obtención de cDNA.**

Para cada RNA, en un tubo de PCR (0.2mL) se colocaron 1µl de random primers, 3µl de RNA extraído y 7 µl de agua DEPC. Posteriormente se colocan los tubos a 72°C por 10 min. Luego de esta incubación se colocan los tubos en hielo por 3 minutos. Durante la incubación se prepara una mezcla con 4µl de buffer 5X, 2µl de DTT 0.1M, 0.5µl de RNA´s IN (inhibidor de RNAsas) y 1µl de dNTP´s 10mM. La mezcla se añade al tubo con RNA después de la incubación de 3 minutos en hielo. Luego se añade 1µl de enzima MMLV-RT (transcriptasa reversa) y se mezcla con la pipeta. Se efectúa luego una incubación a 20 - 25°C por 10 minutos. Se coloca el tubo en el termociclador a 37°C por una hora y luego a 95°C por 5 minutos para inactivar la enzima MMLV-RT. Se retira el tubo del termociclador y se hace un choque térmico en hielo. Se centrifuga el tubo en microcentrífuga a 8000 rmp por 10 segundos. Se colocan los tubos a -20°C hasta la realización de la PCR.

#### **4.4.2.4 Cuantificación de cDNA total.**

De manera breve, se emplean 2.5 µl de cDNA y se diluyen con 47.5 µl de agua bidestilada en una celda para biofotómetro. Se mezcla bien la dilución del cDNA por pipeteo y se lee la absorbancia a 260nm en la opción de DNA de cadena sencilla (ss DNA) del biofotómetro. Se programa la dilución 2.5 + 47.5 en el biofotómetro, se introduce una celdilla con agua bidestilada para calibrar cero de absorbancia a 260nm y posteriormente la celdilla con la dilución de cDNA. Se lee ahora la muestra y se obtiene la concentración del cDNA original en ng/µl.

#### **4.4.2.5 Diseño de iniciadores de PCR**

Los iniciadores para leptina, receptor de leptina y receptor 2 de adiponectina , se diseñaron a partir de las secuencias de sus cDNA reportadas para homo sapiens en GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>), manejadas a través de los programas Oligo v4.0 (Wojciech Rychlik,1991), Amplify v1.0 (Hill Engels,1992 University of Wisconsin) y Vector NTI 9.0.0 (Sep.02,2003) de Informax . Estos programas permitieron controlar factores como las temperaturas de alineamiento (T<sub>m</sub>), apareamientos inespecíficos, dímeros de iniciadores , entre otros. Adicionalmente se probó la especificidad de los iniciadores con el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Para la PCR de GAPDH se emplearon secuencias previamente utilizadas en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL y para las PCR de adiponectina y su receptor 1 se emplearon oligonucleótidos previamente reportados (Jonsson, Moschen et al. 2005).

#### **4.4.2.6 Reacciones de PCR del gene de expresión constitutiva y genes de interés.**

Se estandarizaron inicialmente las condiciones de amplificación por PCR para adiponectina, sus dos receptores y GAPDH (control interno) en tejido adiposo humano. Posteriormente esas condiciones se ensayaron en el cDNA de CMN de los diferentes grupos de estudio y controles sanos.

Posteriormente, con esas condiciones estandarizadas se realizaron ensayos de PCR semicuantitativa en el cDNA de CMN de los grupos de estudio y controles sanos, analizando los productos amplificados en las etapas logarítmicas de la reacción por análisis densitométrico en gel de agarosa, empleando el programa Phoretix 1D versión 2003.02.

#### **4.4.2.7 Determinación de las enzimas hepáticas, glucosa y perfil de lípidos.**

Las enzimas hepáticas determinadas fueron aspartatoaminotransferasa (AST), alaninoamino transferasa (ALT), gammaglutamil transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALKP), proteínas totales (PT), albúmina (ALB), lactato deshidrogenada (LDH) y bilirrubinas totales (TBil). Respecto al perfil de lípidos se determinó colesterol total (COL), colesterol HDL (HDLc), triglicéridos (TRIG) y por cálculo matemático las determinaciones de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) y así mismo se determinó la glucosa sérica (GLU).

Las determinaciones mencionadas se llevaron a cabo en el equipo Vitros DT60II System Chemistry y el módulo DTSCII (Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson Co) el cual es un sistema semiautomático de química seca que emplea reacciones colorimétricas, potenciométricas y cinéticas llevadas a cabo en laminillas (DT Slides) en

las cuales se lleva acabo la reacción. Estos valores se determinaron en el suero de los sujetos de estudio y controles. La calidad de las determinaciones es monitoreada a través del empleo de sueros control con valores definidos de los analitos a monitorear.



**Figura 7.** Equipo Vitros DT60II y sus módulos.

#### **4.4.2.8 Determinación de lípidos totales**

Se empleó el método de sulfosfosvainillina de Zollner y Kirsch. Los lípidos reaccionan con el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado caliente y posteriormente con la vainillina en medio ácido para producir compuestos color rosa. El color formado es proporcional a la concentración de lípidos totales y se mide a 530 nm.

La determinación se efectuó de la siguiente forma: se obtiene las muestras de suero después de un ayuno de 12 a 14 horas. Se homogenizaron bien antes de analizarlas. Para comenzar el análisis, se marcan tubos de ensayo como blanco, estándar y muestras. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  del estándar de lípidos al tubo rotulado como estándar. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de muestra a los tubos rotulados como muestras. Se añaden 2mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a los tubos. Se mezclaron bien, y se les colocó torundas de algodón en la boca del tubo. Se incubaron por 10 minutos en baño de agua hirviendo y posteriormente un choque térmico en agua fría por 5 minutos. Se rotuló una nueva serie de tubos como B (blanco), EA (estándar ácido) y MA (muestras ácidas). Se colocaron

entonces las siguientes cantidades: 0.1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en B, 0.1mL de estándar tratado en EA y 0.1ml de muestra tratada en MA. Posteriormente se añadieron 2 mL de reactivo de color en cada uno de los tubos. Se mezcló bien en vórtex por 10 segundos y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias fueron leídas a 530nm ajustando a cero con el blanco. Los Cálculos fueron : Lípidos totales mg/dl = ( Abs muestra/ Abs estándar ) x Concentración del estándar.

Los valores normales esperados son de 450 a 1000 mg/dl después de ayuno de 12 horas. La reacción es lineal hasta 2500 mg/dl.

#### 4.4.2.9 Cuantificación de insulina

La determinación cuantitativa de insulina en suero se realizó empleando el equipo Abbott IMx el cual es un sistema semiautomático que efectúa un enzimoimmunoanálisis de micropartículas (MEIA). Los reactivos IMx Insulin y la muestra se dispensan en la celdilla de reacción en el orden siguiente:

- El conjunto sonda/electrodo dispensa la muestra, las micropartículas recubiertas con anticuerpos (monoclonales de ratón) anti insulina y el buffer de ensayo en el pocillo formando un complejo anticuerpo-Insulina
- Una alícuota de la mezcla con el complejo es transferida a una matriz de fibra de vidrio.
- La matriz es luego lavada para remover materiales no unidos.
- El conjugado anti-insulina fosfatasa alcalina se deposita en la matriz y se une al complejo antígeno-anticuerpo.
- La matriz es lavada para eliminar materiales no unidos
- Se añade el sustrato 4-Metil-umbelliferil fosfato y el producto fluorescente es medido por el sistema óptico del IMx.

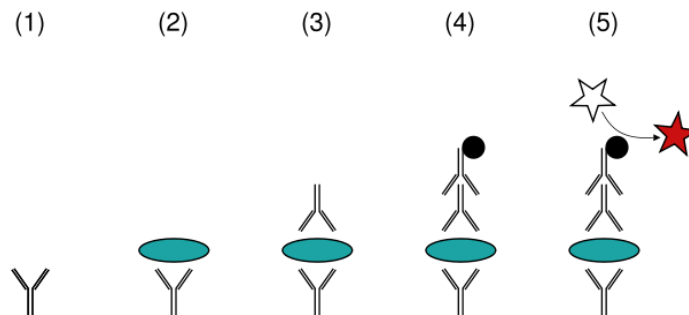


**Figura 8.** Equipo IMx de Abbott.



#### 4.4.2.10 Cuantificación de Adiponectina y Leptina séricas.

Para la determinación de adiponectina y leptina en suero se emplearon estuches comerciales para ensayos ELISA tipo sándwich (Human adiponectin ELISA Kit, CHEMICON INTERNACIONAL) y tipo competitivo (ELISA Leptin versión 5.0 , DRG DIAGNOSTICS) con sensibilidades de 100pg/mL y 0.2ng/mL respectivamente. De forma breve, los pasos generales seguidos fueron: (1) Cubrir la placa con el anticuerpo de captura, (2) se añadió la muestra, y la proteína de interés se une al anticuerpo de captura; (3) se añadió el anticuerpo de detección, que se une a la proteína de interés; (4) se añadió el anticuerpo secundario ligado a enzima, uniéndose al anticuerpo de detección; (5) se añadió el substrato, que fue convertido por la enzima a su forma detectable a determinada longitud de onda para cada ensayo.



**Figura 9.** ELISA tipo sándwich.

#### **4.4.2.11 Determinación del índice de masa corporal (IMC) e índice cintura cadera (ICC).**

Se obtienen el peso (en kilogramos), la estatura (en metros) , la medida de cintura y cadera (en centímetros) de los sujetos de estudio o controles. En el caso del IMC, se obtiene dividiendo el peso por la estatura al cuadrado.

En el caso del ICC, se obtiene dividiendo las medidas (en centímetros) de cintura por la de cadera.

#### **4.4.2.12 Determinación del Índice HOMA-IR y Quicki.**

La evaluación de resistencia a insulina se realizó empleando el modelo de evaluación de homeostasis (HOMA-IR) por sus siglas en inglés, originalmente descrito por Matthews y cols (1985) , mediante la siguiente fórmula:  $HOMA-IR = \frac{\text{insulina en ayuno (uU/mL)} \times \text{glucosa en ayuno (mmol/L)}}{22.5}$ .

La evaluación de sensibilidad a insulina se llevó acabo mediante el índice QUICKI, definida por Katz y cols (2000), mediante la fórmula  $QUICKI = \frac{1}{[\log(\text{Insulina}) + 1 \log(\text{glucosa en ayuno})]}$ .

#### **4.4.2.13 Ensayo de PCR Cualitativo del VHC.**

Esta prueba consiste en una extracción de RNA inicial utilizando el kit comercial QIAmp Viral RNA Mini Kit siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente ya teniendo extraído y empleando de 1-5 ug de RNA se realiza una reacción de retrotranscripción (RT). La reacción de RT se efectuó de la siguiente manera: para cada tubo de 0.2 ml se añadieron 1ul de random primers, 10ul de RNA total y 1ul de dNTP's. La mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y se enfrió en hielo por 2 minutos. Posteriormente se añade una mezcla de 4ul de buffer first strand 5X, DTT 0.1 M , RNase

OUT (40U/ul). Se mezcló el contenido y se incubó a 37°C por 2 minutos. Se agregó entonces 1ul de enzima M-MLV RT (200U/ul) y se mezcló el contenido. Posteriormente los tubos se colocan en termociclador y se someten a 25°C por 10 minutos, 37°C por 50 minutos y 70°C por 15 minutos. Posteriormente se realizó la reacción de PCR empleando los reactivos en las siguientes concentraciones: Buffer 10X en 1X, MgCl<sub>2</sub> en 3.0 mM, dNTP's en 0.2 mM, Oligo 5' (VCL) 0.3 uM, Oligo 3' (VCR) en 0.3 uM, 3-5 ul de cDNA, y Taq Polimerasa (Bioline) en 1.0 U/ul. Posteriormente la reacción se somete a termociclado, 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por un minuto y 72°C por 1 minuto, con un ciclo final de extensión de 72°C por 5 minutos. Los productos amplificados de 243 pares de bases se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% inyectando 10 ul de producto amplificado y tiñiendo posteriormente con bromuro de etidio (0.05ug/mL). Luego se documentaron las imágenes en el equipo LabWorks. La secuencia de los oligonucleótidos empleados fue VCL: GCA GAA AGC GTC TAG CCA TGG CGT y VCR: CTC GCA AGC ACC CTA TCA GGC AGT.

#### **4.4.2.14 Determinación de genotipo del VHC.**

Principio del ensayo.

Esta determinación se realizó mediante el kit de amplificación del VHC (LiPA) VERSANT, que proporciona iniciadores (primers) específicos de la región 5'UTR del VHC para uso en la amplificación.

Utilizando los iniciadores aleatorios en una etapa con transcriptasa inversa (RT), se generan copias de cDNA (DNA complementario) a partir del RNA viral. El cDNA se amplifica utilizando la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y los iniciadores de la PCR del kit para generar el producto de DNA biotinilado amplificado. El kit contiene

iniciadores externos o de primer ciclo e iniciadores anidados. EL producto amplificado puede utilizarse en el ensayo de genotipos del VHC (LiPA) VERSANT, el cual a través de una hibridación inversa se une a tirillas de papel con sondas marcadas, específicas para los genotipos y subtipos del VHC.

#### **4.4.2.15 Determinación de carga Viral de VHC.**

Principio del ensayo.

Esta determinación se realizó mediante la prueba AMPLICOR HCV MONITOR versión 2.0 (Roche, Nichols Institute). Se basa en cinco procesos principales: preparación de las muestras; transcripción reversa del RNA objetivo para generar el cDNA; amplificación por PCR del cDNA objetivo usando iniciadores complementarios específicos del VHC; hibridación de los productos amplificados a sondas oligonucleótidos específicas para el o los objetivos y detección mediante determinación colorimétrica de los productos unidos a la sonda.

Esta prueba permite la transcripción reversa y la amplificación de PCR simultánea del RNA del VHC, y el RNA de un patrón de determinación cuantitativa del VHC. El reactivo de mezcla maestra (master mix) contiene un par de iniciadores específicos del RNA del VHC y del RNA estándar interno de cuantificación del VHC. Este mix permite la detección cuantitativa de todos los genotipos conocidos del VHC.

El estándar interno de cuantificación es un transcripto de RNA de VHC de 351nt, no infeccioso que contiene los mismos sitios de unión al iniciador que el RNA objetivo del VHC y una región única de unión a la sonda, que permite distinguir el amplicón del estándar interno del amplicón del VHC. El estándar interno se incorpora dentro de cada

muestra individual en un número de copias conocido y se somete a los pasos de preparación de muestras, transcripción reversa, amplificación por PCR e hibridación y detección junto al RNA del VHC. Las concentraciones del RNA del VHC en las muestras de prueba se determinan comparando la señal del VHC con la señal del estándar interno. El estándar interno contiene regiones de unión a los iniciadores KY78 y KY80 y genera un producto de la misma longitud (244 bases) y composición de bases que el RNA blanco del VHC. El estándar interno del VHC se normaliza frente al Estándar Internacional del VHC para pruebas con tecnología de ácido nucleico (TAN) de la OMS 96/790 y la concentración se expresa en unidades internacionales (UI)/PCR.

Dentro del rango lineal del ensayo, la densidad óptica (DO) en cada pocillo de la microplaca es proporcional a la cantidad de amplicón del VHC o de amplicón del estándar interno del VHC en el pocillo. La DO total calculada es proporcional a la cantidad del RNA del VHC o RNA del estándar interno del VHC, respectivamente, presente en cada reacción de transcripción reversa/ amplificación por PCR.

La cantidad del RNA del VHC de cada muestra y control se calcula a partir de la relación DO total del VHC/DO del estándar interno del VHC y el número de moléculas de RNA del estándar interno de VHC agregadas, usando la ecuación:

$$\frac{\text{DO total del VHC}}{\text{DO total del QS}} \times \text{UI del QS del VHC agregadas/PCR} \times 200 = \text{UI de RNA del VHC/ml}$$

Donde:

DO total del VHC: DO total calculada del amplicón del VHC

DO total del QS: DO total calculada para el amplicón del estándar interno

UI del VHC agregadas/PCR: el número de unidades internacionales del estándar interno en cada reacción (valor específico de cada lote)

200: Factor para convertir UI/PCR a UI/mL.

## **CAPITULO V.**

---

### **RESULTADOS.**

#### **5.1 Obtención de CMN de sangre periférica de los sujetos de estudio y controles.**

Se empleó la técnica de venopunción en cada sujeto de estudio y control. Posteriormente se obtuvo la fracción de CMN mediante gradiente en Ficoll Paque PLUS para cada muestra. Las células obtenidas de cada muestra fueron suspendidas en 400ul de solución buffer diluyente para sangre total ( preparada según indicaciones del fabricante) y posteriormente almacenadas a -70°C hasta la extracción de RNA.

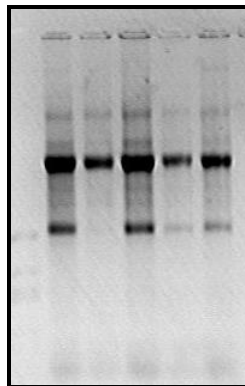
#### **5.2 Extracción de RNA.**

##### **5.2.1 Extracción de RNA total de tejido adiposo.**

En el caso del tejido adiposo se emplearon 5mm<sup>3</sup> de tejido adiposo humano, que fueron macerados en 600 µl de trizol frío y posteriormente se aplicó la técnica de extracción de RNA.

### 5.2.2 Extracción de RNA total de CMN

Los RNA totales fueron extraídos de cada muestra empleando Trizol (Invitrogene) según las recomendaciones del fabricante. La integridad de los mismos se analizó mediante geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes empleando bromuro de etidio.



**Figura 10.** RNA total de 5 sujetos de estudio donde se observan las bandas características. Se inyectaron 2 $\mu$ l de RNA total en el gel desnaturalizante con bromuro de etidio.

### 5.2.3 Reacción de Retrotranscripción (RT) para la obtención de cDNA.

En el caso del tejido adiposo, se sintetizó el cDNA por retrotranscripción mediante reacciones de RT, obteniéndose alrededor de 1300 ng/ $\mu$ l por espectrofotometría. En el caso de las CMN, se sintetizaron los cDNA's para cada muestra y control también por reacciones de RT. Los cDNA's fueron posteriormente cuantificados por espectrofotometría, obteniéndose cantidades variables de cDNA, oscilando entre los 500 y 1200 ng/ $\mu$ l.

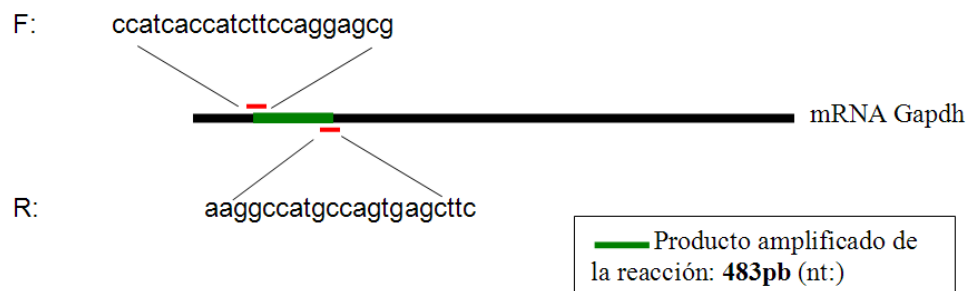
### 5.2.4 Diseño de oligonucleótidos y estandarización de reacciones de PCR.

Se emplearon los siguientes software: Oligo v4.0 (Wojciech Rychlik,1991), Amplify v1.0 (Hill Engels,1992 University of Wisconsin) y Vector NTI 9.0.0 (Sep.02,2003) de Informax, que permitieron controlar factores como las temperaturas de alineamiento (Tm) , apareamientos inespecíficos, dímeros de iniciadores, entre otros. Adicionalmente se probó la especificidad de los iniciadores con el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Para la PCR de GAPDH se emplearon secuencias previamente utilizadas en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL. Se empleó la secuencia con número de acceso BC051858 de GenBank para el diseño de oligonucleótidos que amplificaran un fragmento de 214pb, correspondiente al receptor 2 de adiponectina. Para los ensayos de PCR para adiponectina y su receptor 1 se emplearon oligonucleótidos previamente reportados (Johnson, Moschen et al. 2005).

#### 5.2.4.1 Glicer aldehído 3-Fosfato Deshidrogenada (GAPDH).

Se emplearon oligonucleótidos sintetizados que ya se tenían en el Lab. de Infectología de la Facultad de Medicina de la UANL para amplificar un fragmento de 483pb del gene del glicer aldehído 3´ fosfato deshidrogenasa.

**Figura 11.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mRNA de GAPDH.

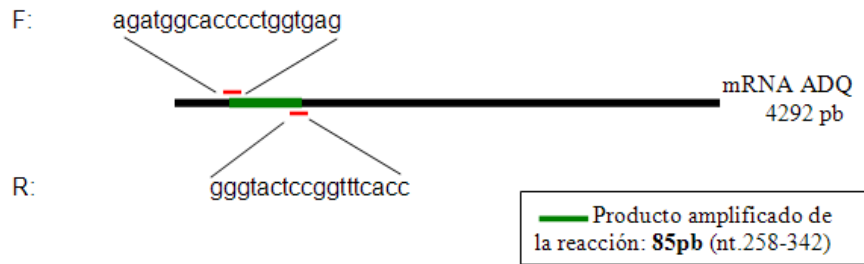




### 5.2.4.2 Adiponectina (ADQ):

Se sintetizaron oligonucleótidos reportados previamente (Johnson, Moschen et al. 2005) que amplifican un producto de 85 pb.

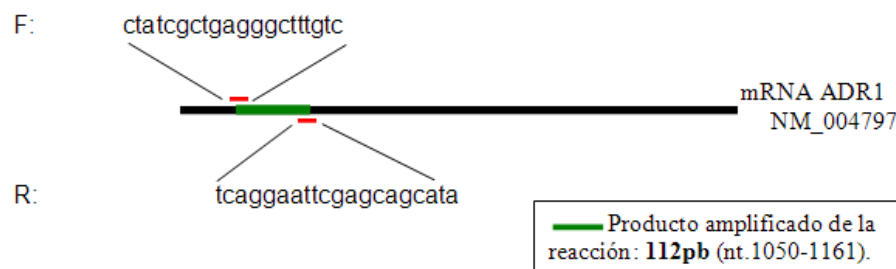
**Figura 12.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mRNA de ADQ



### 5.2.4.3 Receptor 1 de adiponectina (ADR1):

Se emplearon oligonucleótidos previamente reportados (Johnson, Moschen et al. 2005) que amplifican un producto de 112pb. Las secuencias se alinearon contra la secuencia del receptor 1 de adiponectina humana reportada en GenBank con número de acceso NM\_004797 para comprobar su complementariedad.

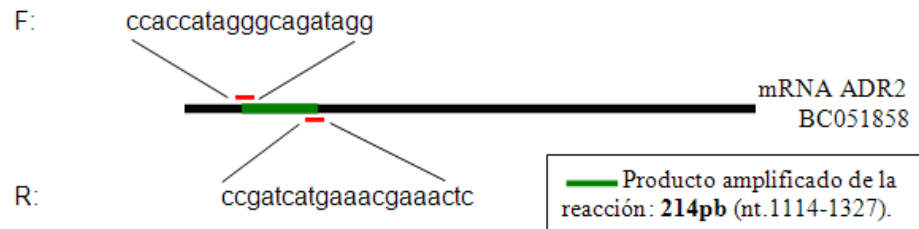
**Figura 13.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mRNA de ADR1.



#### 5.2.4.4 Receptor 2 de adiponectina (ADR2):

Se empleó la secuencia con número de acceso BC051858 de GenBank, correspondiente al mRNA de ADR2 humano para el diseño de los oligonucleótidos para PCR. Las secuencias diseñadas amplificaron un producto de 214pb.

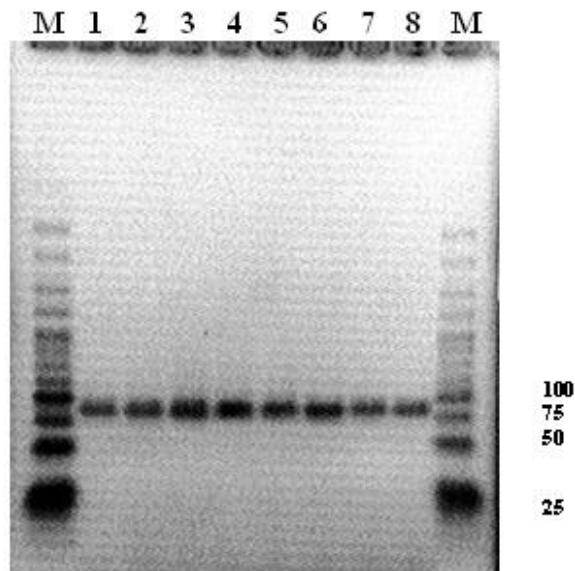
**Figura 14.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación del mRNA de ADR2.



## 5.2.5 Ensayos de PCR cualitativo y semicuantitativo.

### 5.2.5.1 Adiponectina en tejido adiposo:

Con los oligonucleótidos empleados se obtuvo amplificación de la adiponectina en 750 ng de tejido adiposo humano, incluso a distintas temperaturas de alineamiento en un rango de 42°C a 60°C y con un producto único de amplificación.

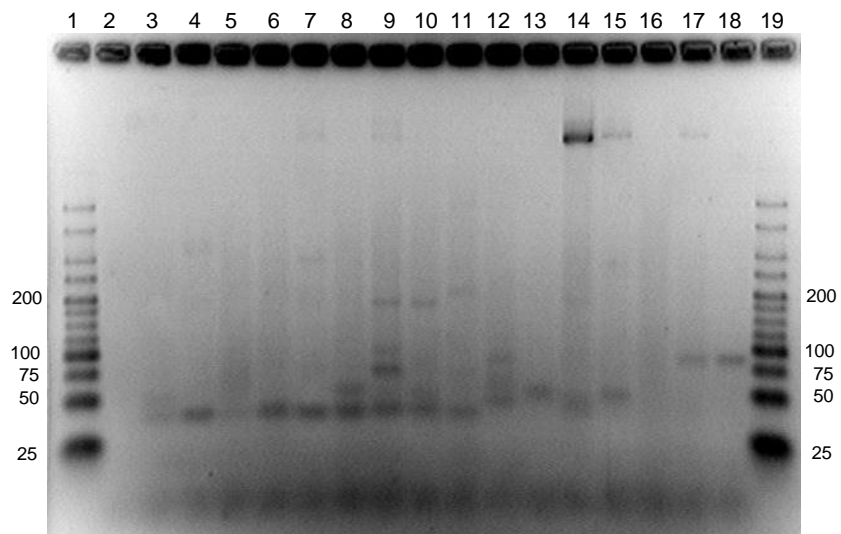


**Figura 15.** Gel de agarosa al 3.5% del producto amplificado de adiponectina (85pb) a distintas temperaturas de alineamiento en un rango de 42-60°C. Se observa una banda de amplificación específica.

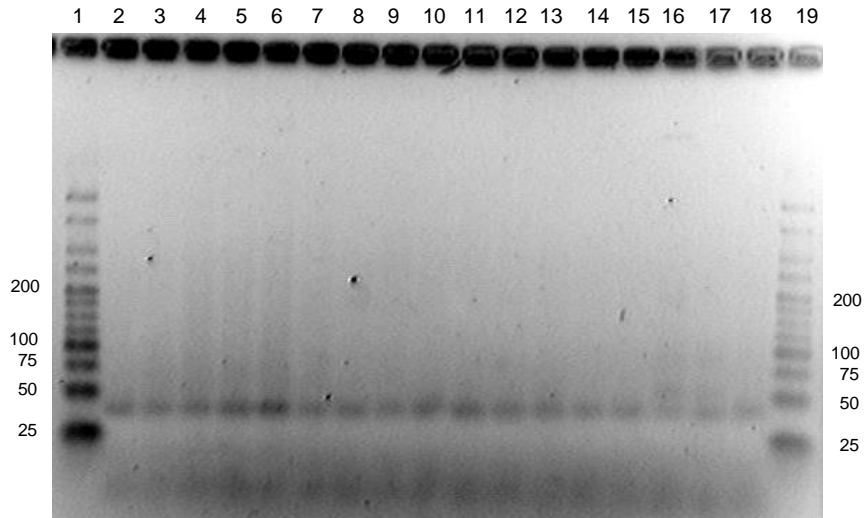
### 5.2.5.2 Adiponectina en CMN de grupos de estudio y controles sanos.

Ya que los oligonucleótidos presentaron muy alta especificidad en la reacción, se emplearon las condiciones que mostraron mejor intensidad de la banda esperada y se ensayaron para ver si había expresión de adiponectina en el cDNA de las CMN de los grupos de estudio y controles sanos.

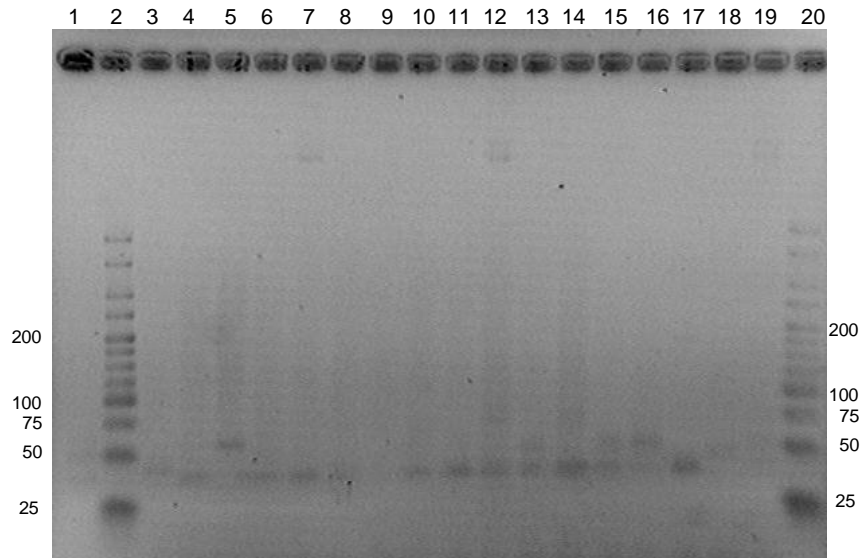
Con las condiciones ensayadas en concentración de 2000ng de cDNA de CMN de sujetos sanos y los diferentes grupos de estudio, no se encontró expresión de adiponectina en estos grupos.



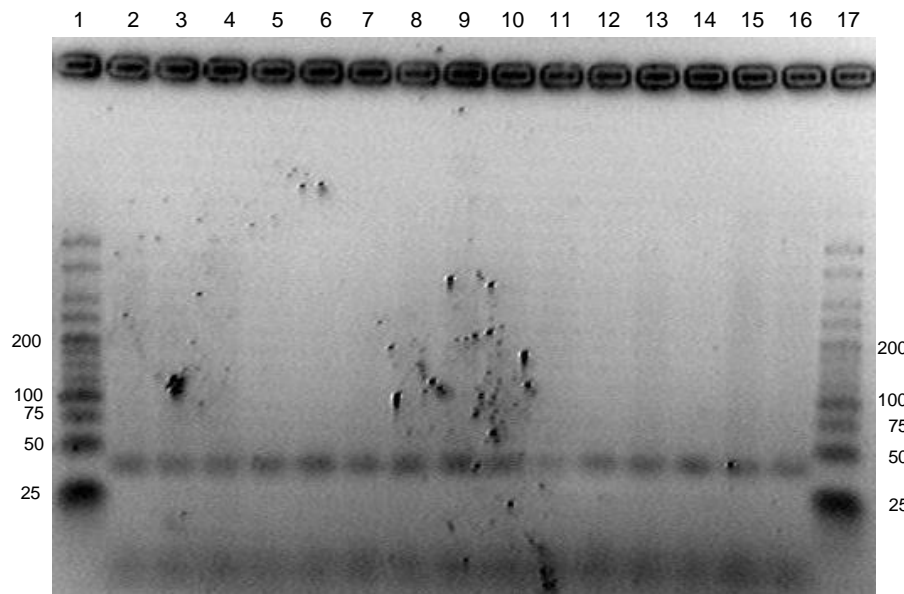
**Figura 16.** Gel de agarosa al 3.5%. Expresión no detectada del fragmento amplificado de ADQ (85 pb) en 15 de los 27 controles sanos. Carriles 1 y 19: Marcadores de peso molecular (pb). Carriles 2-16: controles sanos. Carriles 17-18: Control positivo de expresión.



**Figura 17.** Gel de agarosa al 3.5%. Expresión no detectada del fragmento amplificado de ADQ (85 pb) en pacientes con esteatosis, EHNA o VHC. Carriles 1 y 19: Marcadores de peso molecular (pb). Carriles 2-8: controles hepatópatas con esteatosis. Carriles 9-15: controles hepatópatas con EHNA. Carriles 16-18: tres de los 39 pacientes con VHC. El control positivo de expresión se inyectó en el gel anterior (misma corrida de PCR que en controles sanos).



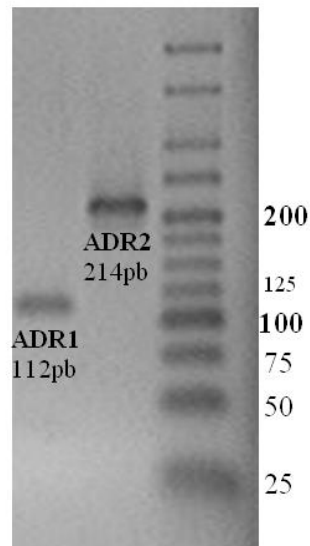
**Figura 18.** Gel de agarosa al 3.5%. Expresión no detectada del fragmento amplificado de ADQ (85 pb) en 17 pacientes de los 39 con VHC. Carriles 1 y 20: Marcadores de peso molecular (pb). Carriles 1 y 3-19: 17 pacientes con hepatitis C. El control positivo de expresión se inyectó en el gel de la corrida de PCR de controles sanos.



**Figura 19.** Gel de agarosa al 3.5%. Expresión no detectada del fragmento amplificado de ADQ (85 pb) en 6 pacientes con HAI y 9 con cirrosis criptogénica. Carriles 1 y 17: Marcadores de peso molecular (pb). Carriles 2-7: pacientes con HAI. Carriles 8-16: sujetos con cirrosis criptogénica. El control positivo de expresión se inyectó en el gel de la corrida de PCR de controles sanos (misma corrida de PCR).

### 5.2.5.3 Expresión cualitativa de los receptores 1 y 2 de adiponectina en tejido adiposo humano.

Con los oligonucleótidos diseñados se obtuvo amplificación para los receptores 1 y 2 de la adiponectina en 750 ng de cDNA de tejido adiposo humano. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1) un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos (inicio caliente para la enzima Taq polimerasa), 40 ciclos de las etapas 2) 95°C /1min , 3)55°C /1 min , 4)72°C /5 min., y 5) un ciclo extensión final de 72°C /5 min.

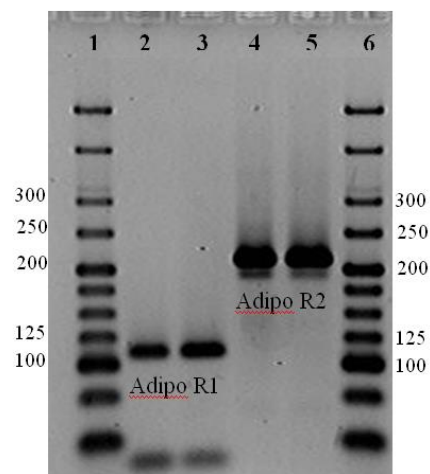


**Figura 20.** Gel de agarosa al 3.5% donde se muestran los productos amplificados de ADR1 y ADR2 en 750ng de cDNA de tejido adiposo humano.

#### 5.2.5.4 Expresión cualitativa de los receptores 1 y 2 de adiponectina en CMN.

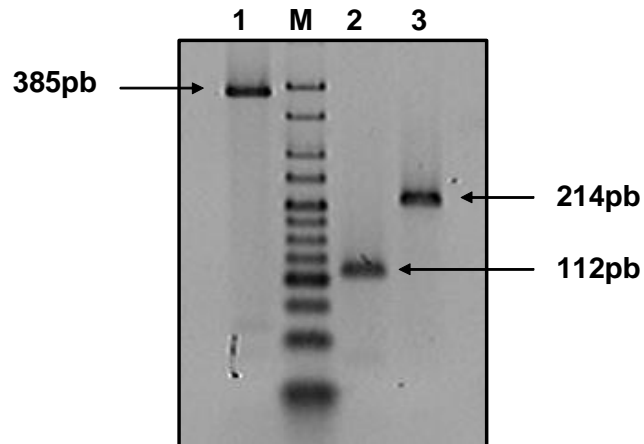
Condiciones que se ensayaron: 1) un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min. (inicio caliente para la enzima Taq polimerasa), 40 ciclos de las etapas 2) 95°C /1min. , 3)55°C /1 min. , 4)72°C /5 min., y 5) un ciclo extensión final de 72°C /5 min.

Se ensayaron las condiciones anteriores con 750 y 1000 ng de cDNA de CMN de un sujeto sano y también se obtuvo expresión de ambos receptores:



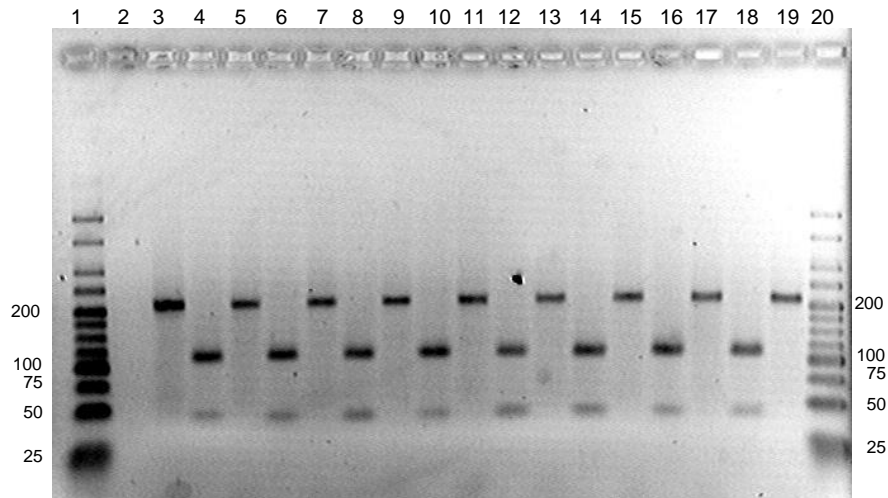
**Figura 21.** Gel de agarosa al 3.5%. Orden de los carriles: 1.Marcador de PM 2. AdipoR1, 112pb, con 750ng cDNA 3.AdipoR1, 112pb, con 1000ng cDNA. 4. AdipoR2, 214pb, con 750ng cDNA. 5. AdipoR2, 214pb, con 1000ng cDNA. 6. Marcador de PM. Se obtuvieron buenos productos amplificados a ambas concentraciones de cDNA. Se pudo usar menos pero a menor concentración la amplificación de GAPDH no ha mostrado buena banda de amplificación, así que se usó como mínimo 750 ng para los receptores y GAPDH.



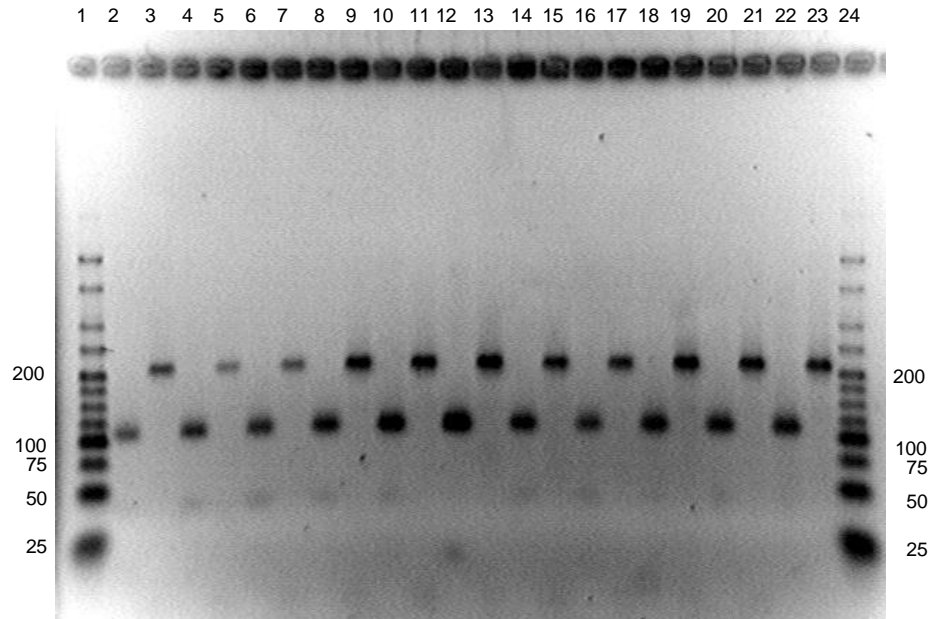


**Figura 22.** Expresión de GAPDH (carril 1), ADR1(carril 2) y ADR2 (carril 3), en un sujeto sano. M: Marcador de peso molecular.

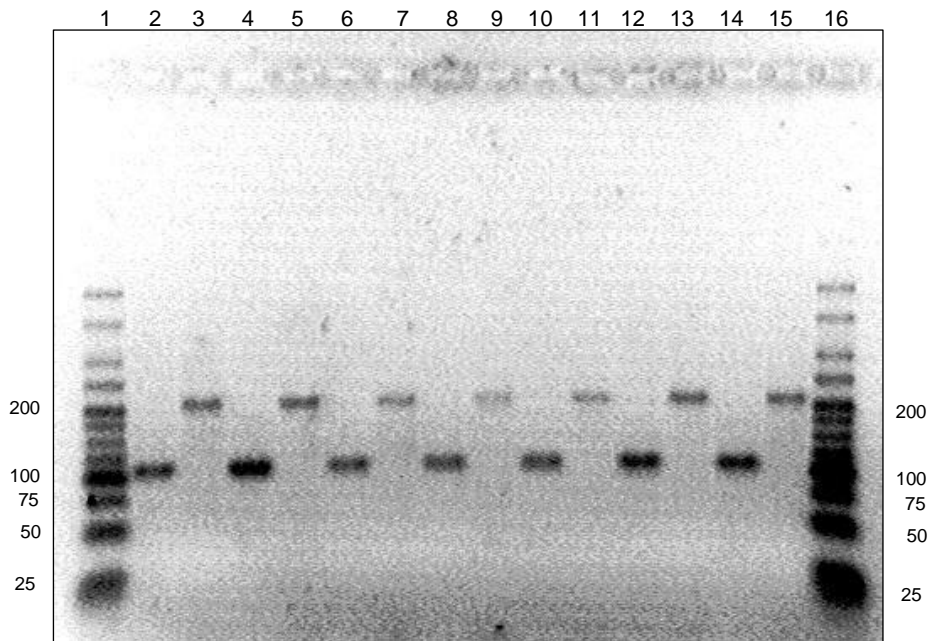
**5.2.6 Expresión cualitativa de los receptores 1 y 2 de adiponectina en los diferentes grupos de estudio.**



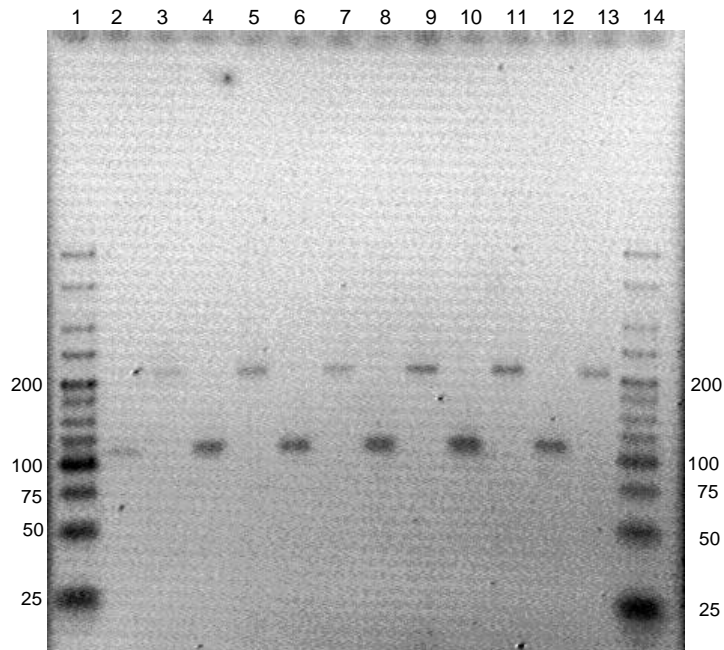
**Figura 23.** Expresión de ADR1 (112pb) y ADR2 (214pb) en 8 de 34 sujetos del grupo con infección por VHC. Carriles 1 y 20: Marcador de peso molecular. Carriles en parejas: 2-3, 4-5, 6-7, y consecutivamente: expresión de ADR1 y ADR2 de 9 sujetos con infección por VHC.



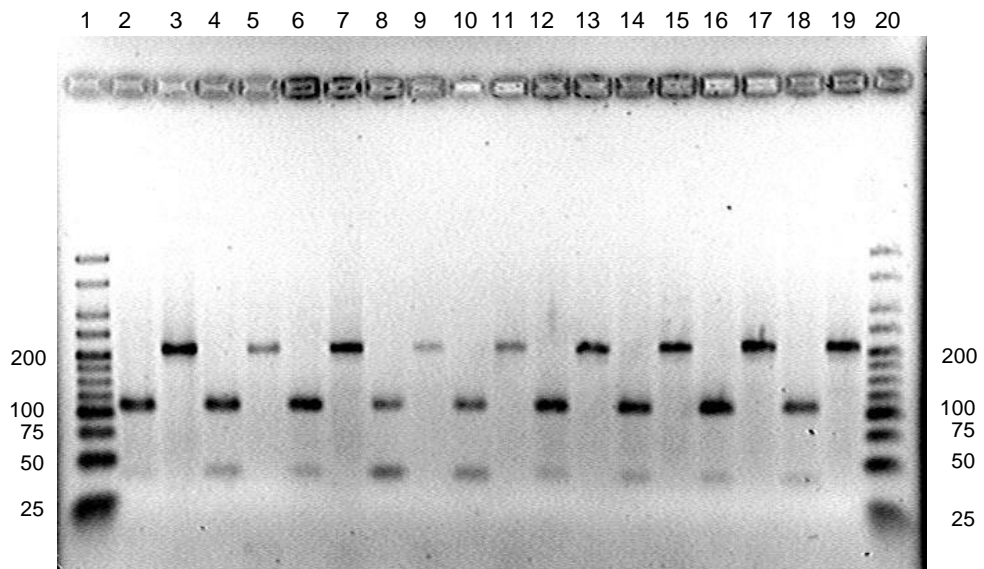
**Figura 24.** Expresión de ADR1 (112pb) y ADR2 (214pb) en 11 sujetos del grupo control sano. Carriles 1 y 24: Marcadores de peso molecular.



**Figura 25.** Expresión de ADR1 (112pb) y ADR2 (214pb) en 4 sujetos con hepatitis autoinmune (carriles 2-3,4-5,6-7,8-9) y 3 sujetos con hepatitis alcohólica (carriles 10-11,12-13,14-15). Carriles 1 y 16: Marcador de peso molecular.



**Figura 26.** Expresión de ADR1 (112pb) y ADR2 (214pb) en 1 sujeto con hepatitis criptogénica (carriles 2-3), 4 sujetos con EHNA (carriles 4-5, 6-7,8-9,10-11) y 1 sujeto con hepatitis autoinmune (carriles 12-13). Carriles 1 y 14: Marcador de peso molecular.

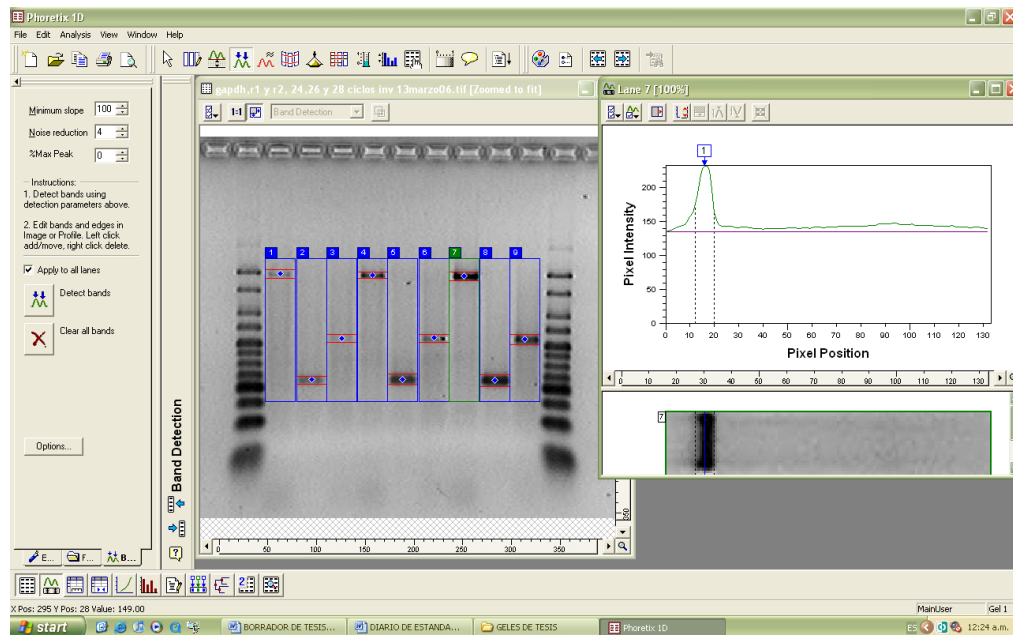


**Figura 27.** Expresión de ADR1 (112pb) y ADR2 (214pb) en 5 sujetos con VHC (carriles 2-3,4-5,6-7,8-9,10-11), y 4 sujetos con esteatosis (carriles 12-13,14-15,16-17,18-19). Carriles 1 y 20: Marcador de peso molecular.

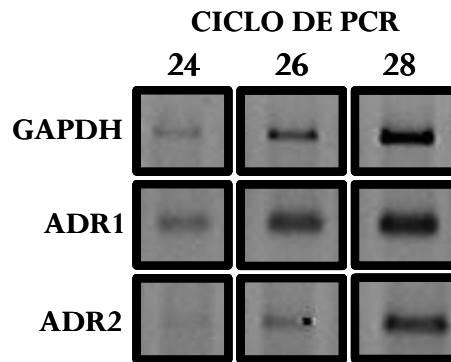
## 5.2.7 Determinación de la expresión semicuantitativa de ADR1 y ADR2 en CMN.

Con las condiciones establecidas en el punto anterior se realizaron los ensayos semicuantitativos para los receptores 1 y 2 de adiponectina y GAPDH en los grupos de estudio y controles.

Se analizaron los productos amplificados en distintos ciclos de la fase logarítmica de la PCR (ciclos 26, 28) y también al ciclo 30 ya que en muchos casos no se detectaba la banda de GAPDH. Las imágenes de los geles de agarosa al 3.5% fueron fotodocumentadas luego de ser teñidos en buffer TBE con bromuro de etidio al 0.05% durante 15 a 20 minutos.



**Figura 28.** Imagen representativa del análisis densitométrico de los productos amplificados de una muestra a 24, 26 y 28 ciclos de PCR.



**Figura 29.** Análisis de amplicones de ADR1, ADR2 y GAPDH. Cada paciente o control se analizó a un ciclo determinado entre los ciclos 26-28. Los datos densitométricos se obtuvieron con el software Phoretix TM1D ver.2003.02

Los datos de expresión relativa (ER) de cada gene de interés respecto al gene control se realizaron dividiendo el dato numérico de densidad óptica (D.O.) del gene de interés por el del gene control.

### 5.2.8. Datos obtenidos de la expresión de ADR1 y ADR2 en los grupos de estudio.

**Tabla 1.** Datos de expresión relativa (ER) de ADR1 y ADR2 en el Grupo VHC (n=38).

Sujeto	Sexo M/F	Edad	E.R. ADR1	E.R. ADR2
1	M	44	5.18	1.46
2	M	33	2.20	1.09
3	M	35	3.02	1.23
4	F	48	3.89	2.11
5	M	34	4.97	2.23
6	F	38	1.51	0.86
7	M	36	0.28	0.94
8	F	58	0.22	0.98
9	F	30	2.43	1.43
10	F	55	1.29	1.55
11	M	28	2.72	5.79
12	F	65	1.01	2.97
13	F	47	0.57	1.65
14	F	49	0.27	1.43
15	M	46	1.46	0.96
16	F	46	2.16	1.51
17	F	51	0.82	0.68
18	F	45	2.55	2.09
19	F	59	7.39	3.20

Sujeto	Sexo M/F	Edad	E.R. ADR1	E.R. ADR2
20	M	50	8.15	5.96
21	F	54	9.81	7.98
22	F	54	7.26	5.17
23	F	56	10.1	7.82
24	F	51	3.75	3.10
25	F	38	3.34	2.43
26	M	51	4.22	3.07
27	M	56	4.78	3.26
28	M	40	2.05	1.93
29	F	48	7.70	4.19
30	F	41	2.25	1.64
31	F	61	6.86	4.08
32	M	36	7.47	4.96
33	F	51	1.02	2.22
34	M	56	0.36	0.52
35	M	32	0.54	1.65
36	F	54	0.33	0.82
37	F	49	0.91	1.18
38	F	33	0.82	0.37

**Tabla 2.** Datos de expresión relativa (ER) de ADR1 y ADR2 del Grupo control sano (n=27).

Sujeto	Sexo M/F	Edad	E.R. ADR1	E.R. ADR2
1	M	39	4.05	2.62
2	M	28	1.72	1.19
3	M	38	7.67	3.3
4	F	33	4.17	2.66
5	M	32	2.23	1.27
6	F	59	6.65	6.18
7	F	29	2.34	1.92
8	F	30	2.99	2.24
9	M	27	3.59	3.24
10	F	69	0.29	0.23
11	F	42	2.7	2.47
12	F	45	3.36	3.17
13	M	46	3.27	2.69
14	F	46	1.32	0.83

Sujeto	Sexo M/F	Edad	E.R. ADR1	E.R. ADR2
15	F	40	1.17	0.86
16	F	57	2.45	1.97
17	M	45	1.61	1.3
18	F	50	1.57	1.09
19	F	58	0.52	0.55
20	F	34	2.18	1.58
21	M	49	0.26	0.26
22	M	37	1.04	0.74
23	F	36	0.59	0.47
24	F	56	0.9	0.82
25	M	33	0.97	0.63
26	F	46	1.88	1.01
27	F	32	1.24	0.93

**Tabla 3.** Datos de expresión relativa (ER) de ADR1 y ADR2 del Grupo control hepatópata (n=34).

Sujeto	Sexo M/F	Edad	E.R. ADR1	E.R. ADR2
<b>Grupo con Esteatosis (n=7)</b>				
1	F	44	2.95	3.64
2	F	58	1.51	0.95
3	F	55	2.19	1.5
4	M	45	2.39	1.88
5	M	44	1.86	1.76
6	F	52	0.4	0.8
7	F	35	0.64	0.24
<b>Grupo con EHNA (n=7)</b>				
8	F	50	4.06	3.87
9	M	39	0.98	0.41
10	M	64	1.67	0.66
11	F	49	0.72	0.32
12	F	23	0.93	0.42
13	M	40	0.34	0.88
14	M	58	0.94	2.52
<b>Grupo con HAI (n=6)</b>				
15	F	24	1.26	0.66
16	F	38	1.64	0.92
17	F	54	1.25	0.53
18	F	55	1.82	0.83

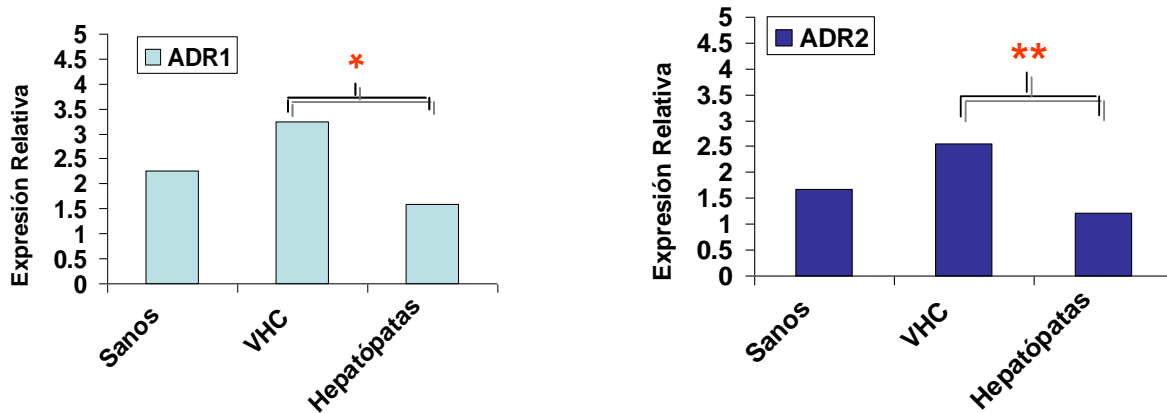
19	F	67	5.19	2.57
20	F	54	0.19	0.54
<b>Grupo con Hepatopatía por Alcohol (n=4)</b>				
21	M	59	1.45	0.79
22	M	59	1.42	0.6
23	M	51	0.92	0.47
24	M	53	2.54	0.97
<b>Grupo con hepatopatía criptogénica (n=10)</b>				
25	F	34	1.19	1.01
26	M	53	1.77	1.27
27	F	63	2.57	2.22
28	M	65	0.96	0.68
29	F	75	1.28	1.12
30	F	63	2.75	1.98
31	F	67	1.02	0.78
32	F	55	2.32	1.61
33	F	52	0.92	0.79
34	M	56	0.69	1.48

**Tabla 4.** Datos comparativos de la expresión de ADR1 y ADR2 en los grupos de estudio.

Marcador	Grupos de estudio		
	Hepatitis C	Controles Sanos	Controles Hepatópatas
<i>mRNA ADQ</i>	ND	ND --	ND --
<i>mRNA ADR1</i>	3.25 ± 2.91	2.25 ± 1.79 P= 0.387	1.60 ± 1.05 P= 0.037 *
<i>mRNA ADR2</i>	2.56 ± 1.96	1.67 ± 1.31 P= 0.067	1.22 ± 0.89 P <0.0001 **

Valores de expresión relativa normalizados contra GAPDH. Datos expresados como media ± DE. Significancias obtenidas con la prueba U de Mann Whitney. Valores de significancia a p<0.05. N.D. No detectado.

**Figura 30.** Datos comparativos de la expresión de ADR1 y ADR2 en los grupos de estudio.





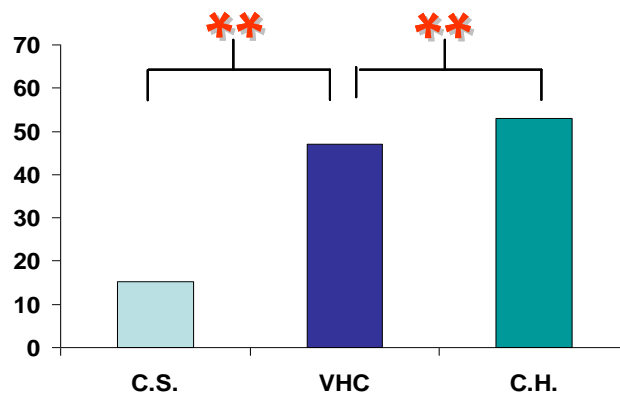
**5.2.9 Determinación de los niveles séricos de adiponectina, leptina, carga viral y genotipo del VHC, así como los parámetros bioquímicos en pacientes con hepatitis C vs. Grupos control.**

Se encontró diferencia significativa entre las concentraciones séricas de ADQ del grupo VHC respecto a controles sanos y hepatópatas.

**Tabla 5.** Comparación de adipocinas entre los grupos de estudio.

Variable	Hepatitis C n=38	Controles sanos n= 27	Controles Hepatópatas n= 34
Adiponectina sérica (µg/ml)	47.0 ± 7.92	15.2 ± 6.1 <b>p&lt;0.0001</b>	53.10 ± 13.4 <b>p&lt;0.0001</b>

Datos expresados como media ± DE. Significancias obtenidas con la prueba U de Mann Whitney. Valores de significancia a p<0.05.



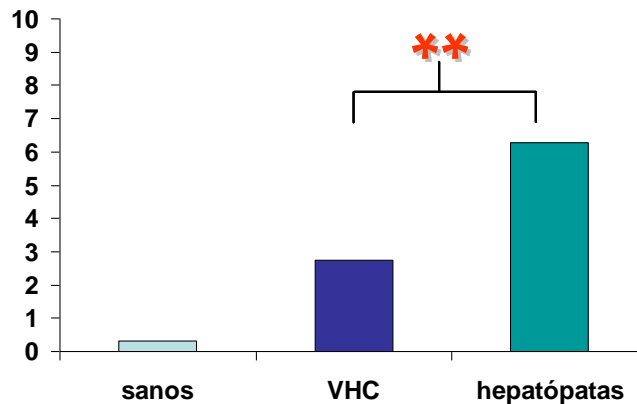
**Figura 31.** Comparación de los niveles séricos de adiponectina en el grupo control sano (C.S), grupo VHC, y controles hepatópatas (C.H).

Se encontró diferencia significativa entre las concentraciones séricas de leptina solamente entre el grupo VHC y los controles hepatópatas.

**Tabla 6.** Comparación de niveles de leptina sérica entre los grupos de estudio.

Variable	Hepatitis C n=38	Controles sanos n= 27	Controles Hepatópatas n= 34
Leptina Sérica (ng/ml)	2.76 ± 4.26	0.30 ± 0.54 p=0.085	6.28 ± 6.39 <b>p=0.005</b>

Datos expresados como media ± DE. Significancias obtenidas con la prueba U de Mann Whitney. Valores de significancia a  $p < 0.05$ .



**Figura 32.** Comparación de niveles de leptina sérica entre los grupos de estudio .Datos expresados como media ± DE. Significancias obtenidas con la prueba U de Mann Whitney. Valores de significancia a  $p < 0.05$ .

### 5.2.10 Comparación de las variables antropométricas, bioquímicas y virales entre los grupos VHC y controles sanos.

Se encontraron diferencias significativas entre los sujetos VHC vs controles sanos en la mayoría de los parámetros bioquímicos y metabólicos analizados, a excepción de niveles de glucosa y albúmina.

**Tabla 7.** Se muestran las variables demográficas, antropométricas, clínicas y virales para los grupos VHC y controles sanos.

VARIABLES	GRUPOS		
	VHC n=38	Controles sanos n= 27	P
<b>Edad</b>	42.26 ± 9.56	42.07± 10.9	0.074
<b>Peso</b>	71.7 ± 16.81	61.05± 10.7	<b>0.012</b>
<b>IMC</b>	27.67 ± 6.37	22.64± 2.58	<b>0.001</b>
<b>ICC</b>	0.94 ± 0.09	0.87± 0.1	<b>0.013</b>
<b>HOMA IR</b>	131.99 ± 164.1	37.3 ± 16.4	<b>&lt;0.0001</b>
<b>QUICKI</b>	0.31 ± 0.04	0.35 ± 0.02	<b>&lt;0.0001</b>
<b>GLUCOSA (mg/dl)</b>	112.9 ± 55.2	94.0 ± 7.6	0.594
<b>Insulina (uU/ml)</b>	23.91 ± 24.33	8.89 ± 3.77	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Carga Viral detectable</b>	32/38	No aplica	--
<b>Genotipo VHC</b>	1a/1b(5), 1a(6),1b(10),3a(2), 2b(2),12 (N.D.)	No aplica	--

Datos expresados como media ± desviación estándar, en los demás casos como la proporción de pacientes del total con una característica dada.

**Tabla 8.** Se muestran las variables bioquímicas para los grupos VHC y controles sanos.

VARIABLES	GRUPOS		
	Grupo VHC n=38	Controles sanos n= 27	P
AST (U/L)	70.57± 61.8	16.1± 10.83	<0.0001
ALT (U/L)	60.21± 47.6	25.6± 8.9	<0.0001
ALP (U/L)	107.73± 57.2	64.7± 16.2	<0.0001
GGT (U/L)	91.29± 110.4	23.6±8.8	<0.0001
LDH (mg/dl)	520.4± 198.2	427.1± 84.9	0.009
ALB (mg/dl)	3.57± 0.68	3.4± 0.28	0.058
COLESTEROL (mg/dl)	148.58± 37.1	187.8± 27.2	<0.0001
Triglicéridos (mg/dl)	123.45± 94.4	78.6± 36.5	<0.0001
VLDL (mg/dl)	24.73± 18.84	15.6± 7.3	<0.0001
HDL (mg/dl)	44.42± 13.26	54.8± 14.2	0.002
LDL (mg/dl)	79.43± 33.4	117.3± 25.1	<0.0001

Al analizar el grupo VHC vs controles hepatópatas sólo se encontró diferencia significativa entre edad y niveles de AST. El grupo con VHC mostró mayor resistencia a la insulina que el grupo control sano, medida a través de los índices HOMA IR y Quicki.

### 5.2.11 Comparación de las variables antropométricas, bioquímicas y virales entre los grupos VHC y controles hepatópatas.

**Tabla 9.** Resultados comparativos obtenidos de las variables demográficas (edad), antropométricas (peso, IMC, ICC), bioquímicas y/o metabólicas (HOMA IR, Quicki, glucosa, insulina) y virales en los grupos VHC Vs Controles hepatópatas.

VARIABLES	GRUPOS		
	Grupo VHC (n=38)	Controles Hepatópatas (n= 34)	P
Edad	42.26 ± 9.56	51.56 ± 11.9	<b>0.024</b>
Peso	71.7 ± 16.81	75.47± 16.42	0.370
IMC	27.67 ± 6.37	29.69 ± 7.22	0.355
ICC	0.94 ± 0.09	0.92 ± 0.08	0.407
HOMA IR	131.99 ± 164.1	99.6 ± 87.8	0.693
QUICKI	0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.672
GLUCOSA (mg/dl)	112.9 ± 55.2	106.0± 32.3	0.664
Insulina	23.91 ± 24.33	19.76 ± 14.33	0.899
Carga Viral detectable	32/38	No aplica	--
Genotipo VHC	1a/1b(5), 1a(6),1b(10),3a(2), 2b(2), 12(N.D.)	No aplica	--

Datos expresados como media ± desviación estándar, en los demás casos como la proporción de pacientes del total con una característica dada.

**Tabla 10.** Datos obtenidos de las variables bioquímicas para los grupos VHC Vs controles hepatópatas.

VARIABLES	GRUPOS		
	Grupo VHC ( n=38)	Controles Hepatópatas (n= 34)	P
AST (U/L)	70.57± 61.76	38.4 ± 26.0	<b>0.020</b>
ALT (U/L)	60.21± 47.65	44.5 ± 25.3	0.155
ALP (U/L)	107.73± 57.21	112.6± 64.8	0.986
GGT (U/L)	91.29± 110.4	69.2± 67.0	0.481
LDH (mg/dl)	520.4± 198.2	516.5± 143.9	0.899
ALB (mg/dl)	3.57± 0.68	3.6± 0.7	0.910
COLESTEROL (mg/dl)	148.58± 37.1	156.2± 46.1	0.463
Triglicéridos (mg/dl)	123.45± 94.4	103.5± 74.4	0.321
VLDL (mg/dl)	24.73± 18.84	21.7± 14.9	0.505
HDL (mg/dl)	44.42± 13.26	45.0± 17.1	0.790
LDL (mg/dl)	79.43± 33.4	90.3± 42.6	0.113

Datos expresados como media ± DE. Significancias obtenidas con la prueba U de Mann Whitney. Valores de significancia a nivel de p<0.05.

**5.2.12 Correlación de niveles plasmáticos de las adipocinas y resultados de la expresión de los mRNA´s de la adiponectina y sus receptores, con los parámetros clínicos, bioquímicos y virológicos en los sujetos incluidos en el estudio.**

**Tabla 11.** Correlaciones de Leptina, adiponectina y sus receptores para el grupo de sujetos con VHC (n=38).

Variables	Adiponectina	Leptina	mRNA ADR1	mRNA ADR2
Adiponectina	---	<b>R= 0.406</b> <b>P= 0.012</b>	R= 0.186 P= 0.262	R= 0.093 P=0.579
Leptina	---	---	R= 0.108 P=0.518	R= 0.188 P =0.259
mRNA ADR1	---	---	---	<b>R= 0.795</b> <b>P &lt;0.001</b>

Significancias obtenidas con la prueba de correlación de Spearman, a nivel de  $p \leq 0.01$ .

**Tabla 12.** Correlación de Leptina, adiponectina y sus receptores con los parámetros antropométricos y bioquímicos en el grupo con VHC (n=38).

Variables	ADQ	Lep	mRNA ADR1	mRNA ADR2
<b>Peso</b>	R=0.140 p: 0.39	<b>R=0.504</b> <b>p = 0.001</b>	R= -0.075 p:0.65	R= -0.073 p: 0.66
<b>IMC</b>	R= 0.181 p:0.275	<b>R= 0.612</b> <b>p &lt; 0.001</b>	R= -0.118 p:0.476	R= -0.02 p:0.90
<b>ICC</b>	R= -0.040 p: 0.81	R= 0.137 p: 0.425	R= -0.06 p:0.72	R= -0.08 p: 0.62
<b>AST</b>	R= -0.03 p:0.85	R=0.242 p:0.143	R= -0.16 p:0.33	R= -0.014 p:0.93
<b>ALT</b>	R= -0.13 p:0.44	R=0.23 p: 0.15	R= -0.04 p:0.79	R= 0.11 p:0.48
<b>ALKP</b>	R=0.02 p:0.89	R=0.148 p: 0.375	R=0.11 p:0.48	R= 0.21 p:0.20
<b>GGT</b>	R= -0.03 p:0.86	R=0.246 p:0.136	R= -0.30 p:0.07	R= -0.18 p:0.26
<b>LDH</b>	R= -0.24 p:0.14	R= 0.00 p:0.99	R= 0.09 p:0.59	R= 0.13 p:0.44

Significancias obtenidas con la prueba de correlación de Spearman, a nivel de  $p \leq 0.01$ .

**Tabla 13.** Correlación de Leptina, adiponectina y sus receptores con los parámetros metabólicos en el grupo con VHC (n=38).

Variables	ADQ	Lep	ADR1	ADR2
<b>QUIKI</b>	R= -0.02 p: 0.90	R= -0.22 p:0.18	R= 0.19 p:0.25	R=0.12 p: 0.46
<b>INSULINA</b>	R=0.14 p:0.38	<b>R= 0.320</b> <b>p:0.049</b>	R= -0.19 p:0.25	R= -0.13 p:0.44
<b>GLUCOSA</b>	R: -0.18 p:0.27	R:0.02 p:0.88	R: -0.002 p:0.98	R: 0.03 p:0.87
<b>HOMA IR</b>	R: 0.03 p:0.87	R:0.22 p:0.17	R: -0.18 p:0.26	R: -0.12 p:0.48

Significancias obtenidas con la prueba de correlación de Spearman, a nivel de  $p \leq 0.05$ .

**Tabla 14.** Correlación de Leptina, adiponectina y sus receptores con el perfil de lípidos y carga viral en el grupo con VHC (n=38).

Variable	ADQ	Lep	ADR1	ADR2
<b>COL.</b>	R= 0.08 p:0.64	R= 0.02 p:0.89	R= 0.06 p:0.69	R= 0.17 p:0.32
<b>LIP.TOT</b>	R= 0.05 p:0.74	R= 0.24 p:0.13	R= -0.06 p:0.69	R= 0.12 p:0.46
<b>HDL</b>	R= -0.06 p:0.71	R= -0.01 p:0.95	R= -0.11 p:0.51	R= 0.25 p:0.13
<b>TRIGL.</b>	R= 0.11 p:0.49	R= -0.03 p:0.85	R= 0.20 p:0.23	R= 0.08 p:0.64
<b>VLDL</b>	R= 0.09 p:0.57	R= -0.05 p:0.77	R= 0.20 p:0.24	R= 0.07 p:0.66
<b>CARGA VIRAL</b>	R= 0.07 p:0.68	R= -0.06 p:0.72	R= -0.11 p:0.50	R= -0.09 p:0.57

Significancias obtenidas con la prueba de correlación de Spearman, a nivel de  $p \leq 0.05$ .

**Tabla 15.** Correlaciones estadísticamente significativas (en rojo) en el grupo VHC con la presencia o ausencia de esas correlaciones en los grupos control sano y control hepatópata.

Variables relacionadas	Grupos		
	VHC n=38	Controles Sanos n=27	Controles Hepatópatas n=34
Leptina-Adiponectina	R= 0.406 P= 0.012	R= 0.35 P=0.07	R=0.086 P=0.632
Leptina-Peso	R=0.504 P= 0.001	R= -0.175 P=0.38	R=0.199 P=0.26
Leptina-IMC	R= 0.612 P < 0.001	R= 0.062 P= 0.75	R=0.306 P=0.08
Leptina-Insulina	R= 0.320 P= 0.049	R= 0.322 P= 0.10	R=0.409 P=0.018
mRNA ADR1-mRNA ADR2	R= 0.795 P <0.001	0.977 P < 0.001	R= 0.69 P<0.001

**Tabla 16.** Análisis de regresión lineal univariado y multivariado en el grupo VHC con carga viral positiva (n=32).

Variable dependiente	Variables Independientes	Univariado			Multivariado				
		B	95%IC	P	B	95%IC	P		
Adiponectina	Diabetes	-0.439	-17.6	-2.38	0.012	-0.818	-42.34	5.08	0.119
	Tipo DM	-0.367	-9.64	-0.28	0.039	0.475	-7.57	20.4	0.355
	mRNA ADR1	0.370	0.70	2.12	0.037	0.268	-0.212	1.80	0.117
Leptina	Peso	0.511	0.053	0.229	0.003	-0.229	-0.235	0.109	0.456
	IMC	0.604	0.221	0.650	<0.001	0.714	0.026	1.005	0.040
	AST	0.446	0.008	0.055	0.011	-0.468	-0.075	0.009	0.118
	ALT	0.559	0.022	0.077	0.001	0.676	0.012	0.108	0.016
mRNA ADR1	Glob	0.391	0.241	3.653	0.027	0.100	-1.542	2.540	0.619
	Adiponectina	0.370	0.008	0.242	0.037	0.149	-0.019	0.120	0.149
mRNA ADR2	mRNA ADR2	0.843	0.975	1.584	<0.001	0.000	0.906	1.529	<0.001
	mRNA ADR1	0.843	0.423	0.687	<0.001	0.518	0.409	0.627	<0.001
mRNA ADR2	HDL	0.064	0.019	0.110	0.007	0.046	0.023	0.069	<0.001



## CAPITULO VI. DISCUSION

---

En numerosas publicaciones se ha descrito la replicación del VHC en CMN, por lo cual el objetivo de este estudio fué estudiar los niveles de expresión del mRNA de ADQ y sus receptores en estas células en sujetos infectados con el VHC.

Se ha reportado que el mRNA de adiponectina es exclusivamente expresado por el tejido adiposo, aunque Kaser y cols (2005) publicaron la detección de bajos niveles de expresión en hígado de sujetos con NASH. Johnson y cols (2005) analizaron biopsias hepáticas y no detectaron dicha expresión. En nuestro estudio el mRNA de ADQ no fue detectable en CMN, aunque fue consistentemente amplificado en tejido adiposo como control de expresión. Los mismos autores presentaron que la ADQ correlacionó de manera negativa con ADR1 pero de manera positiva con ADR2, y que ADR1 estuvo asociado significativamente con IMC. Nuestros resultados de expresión relativa en CMN no mostraron estas correlaciones.

En el mismo trabajo, Johnson y cols. no encontraron correlación de la expresión intrahepática de ADR1 y ADR2 con ALT, HOMA-IR y carga viral. Nuestros resultados de expresión en CMN tampoco detectaron dichas correlaciones.

Chinetti y colaboradores (2004) encontraron expresión de ambos receptores en monocitos humanos diferenciados a macrófagos in vitro y en lesiones ateroscleróticas, reportando además que ADR1 es más abundante que ADR2

en monocitos y que su expresión disminuye durante la diferenciación a macrófagos, mientras que ADR2 permanece constante.

Staiger y cols (2004) encontraron que en cultivos de células de músculo (miotubos) de 40 donadores hubo una expresión de 1.8 veces más de ADR1 que ADR2, y que además la expresión de ambos receptores correlacionaron entre sí ( $r = 0.45$ ,  $P < 0.01$ ). En nuestro estudio se encontró la expresión de los receptores de ADQ en las CMN de todos los grupos analizados, sin embargo la expresión relativa de ADR1 respecto ADR2 fué mayor. También se encontró una correlación estrecha entre ambos receptores. ( $r = 0.795$ ,  $P < 0.01$ ), coincidiendo con lo reportado por estos autores.

Liu y cols (2005) reportaron niveles elevados de leptina sérica en sujetos con VHC y estos correlacionaron positivamente con IMC y Apo B, mientras que la ALT correlaciono con el IMC.

Por otro lado, se ha descrito que los pacientes con infección por VHC presentan como característica histopatológica común la presencia de esteatosis hepática (Brunt , 2001) en la cual la participación de las adipocinas, como la adiponectina y la leptina juegan un rol crucial (Liu y cols, 2005).

En este estudio la medición de leptina mostró niveles más altos en el grupo VHC con respecto al grupo control sano, pero niveles más bajos que el grupo con hepatopatía no viral. Se ha descrito que la presencia del VHC probablemente interfiere con el metabolismo de grasas y niveles de leptina (Staiger y cols, 2004) sin embargo el mecanismo por el cual ejerce estos efectos hasta ahora se desconoce. Por otro lado, en este estudio se observó que los niveles de leptina

en pacientes con hepatopatías no virales mostraron niveles de leptina más altos que el grupo con VHC, por lo que sugerimos que la presencia del VHC de alguna manera influye en la regulación del metabolismo de leptina.

Además se encontró que en el grupo de sujetos con VHC existe correlación de los niveles de leptina con IMC, peso, adiponectina e insulina, pero no con las pruebas de función hepática ni carga viral. Esto sugiere que los niveles de leptina en pacientes con infección crónica por VHC son afectados principalmente por el metabolismo de lípidos y grasas, concordando con los datos reportados por Staiger y cols (2004).

Se ha descrito que una proporción de pacientes infectados con VHC y con esteatosis presentan diversas características clínicas observadas en pacientes con EHNA (Zekry y cols, 2005), cuestionando la significancia de estos desórdenes metabólicos en la patogénesis de la infección por VHC. En nuestro estudio se estableció que diversos parámetros metabólicos como peso, IMC, ICC, Quicki, HOMA-IR e insulina presentaban diferencia estadísticamente significativa con respecto a sujetos sanos. Dichos parámetros se han establecido alterados en pacientes con EHNA, sugiriendo esto que la presencia del VHC pudiera estar implicada en la alteración de estos parámetros antropométricos y metabólicos.

Con respecto a la adiponectina se ha descrito que en pacientes con con infección por VHC niveles bajos de esta adipocina han correlacionado con carga viral alta, genotipo 2 y resistencia a insulina (Liu y cols, 2005). En este estudio sólo se encontró correlación de sus niveles con los niveles de leptina; no se

logró establecer la asociación con genotipo 2 ya que la mayoría de los pacientes presentaron genotipo 1. Aunque se ha reportado que el genotipo 3 está directamente involucrado en el desarrollo de esteatosis hepática en pacientes con VHC, en el presente estudio los niveles de adiponectina no se pudieron correlacionar con genotipo 3 debido a que sólo un paciente del grupo presentó dicho genotipo.

Aunque la adiponectina es producida exclusivamente por los adipocitos, se ha descrito que una hiperadiponectinemia puede ser una consecuencia del daño hepático más severo causado por la infección con el genotipo 1 (Liu y cols, 2005). En este estudio se observaron niveles más elevados de adiponectina en pacientes con VHC que en sujetos sanos, presentando la mayoría de los pacientes del grupo VHC genotipo 1, concordando esto con lo reportado previamente.

En resumen, en este estudio se encontró que no existe expresión del mRNA de ADQ en CMN de SP de los 3 grupos de estudio, que la expresión de los receptores ADR1 y ADR2 se encuentra más alta en sujetos con VHC que en controles sanos y sujetos con hepatopatías no virales. Respecto a los niveles séricos de ambas adipocinas se encontraron niveles más altos en el grupo con VHC respecto al grupo control sano, concordando con lo ya reportado para esta etiología, sin embargo se observó que los niveles de estas adipocinas en pacientes con VHC son menores que en los sujetos con hepatopatías no virales. Se considera que se requieren más estudios para establecer la participación de estas dos adipocinas en la fisiopatogenia de la infección por VHC.

## CAPITULO VII. CONCLUSIONES

---

1. No se encontró expresión del mRNA de adiponectina en CMN de los sujetos incluidos en este estudio.
2. ADR1 y ADR2 mostraron una expresión relativa mayor en los sujetos con VHC respecto a los grupos control. En cada caso la expresión de ADR1 fue mayor que la de ADR2.
3. Los niveles de adiponectina y leptina sérica fueron mayores en los sujetos con VHC respecto al grupo control sano, pero menores respecto al grupo con hepatopatía no viral.
4. Los índices de HOMA IR y Quicki mostraron una resistencia mayor a la insulina en el grupo VHC respecto al grupo control sano.
5. La leptina correlacionó con ALT e IMC en sujetos VHC con carga viral positiva.
6. ADR1 y ADR2 mostraron una correlación en los 3 grupos de estudio, mostrando a su vez una correlación en los sujetos VHC con carga viral positiva mediante análisis multivariado.
7. Nuestros resultados sugieren que la presencia del VHC induce una mayor expresión de los receptores ADR1 y ADR2 en CMN, así como de niveles séricos más altos de adiponectina y leptina en estos sujetos comparados con sujetos sanos. Sin embargo se sugieren más estudios para esclarecer los mecanismos moleculares que definan la participación de estos receptores y adipocinas en la patogénesis del VHC.

## **CAPITULO VIII. PERSPECTIVAS.**

---

1. Establecer posible correlación de niveles de expresión de los receptores (proteína y mRNA) de leptina y adiponectina entre CMN de SP y muestras de tejido hepático.
2. Determinación de los niveles de expresión de leptina y su receptor (mRNA y proteína) en CMN de SP.
3. Establecer si existen diferencias en la expresión y niveles séricos de estas adipocinas en pacientes VHC sometidos a terapia antiviral valorando su respuesta virológica sostenida.

## CAPITULO IX. REFERENCIAS.

---

- Adinolfi, L. E., M. Gambardella, et al. (2001). "Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity." Hepatology **33**(6): 1358-64.
- Alter M.J., Kruszon-Moran D., et al (1994), The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. N Engl J Med; **341**: 556-62.
- Bailey, C. J. and R. C. Turner (1996). "Metformin." N Engl J Med **334**(9): 574-9.
- Bjorbaek, C. and B. B. Kahn (2004). "Leptin signaling in the central nervous system and the periphery." Recent Prog Horm Res **59**: 305-31.
- Blum H.E., (1994). Does hepatitis C virus cause hepatocellular carcinoma? Hepatology; **19**: 251-5.
- Brunt, E. M. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology." Semin Liver Dis **21**(1): 3-16.
- Clarke, B. (1997). "Molecular virology of hepatitis C virus." J Gen Virol **78 ( Pt 10)**: 2397-410.
- Chandran, M., S. A. Phillips, et al. (2003). "Adiponectin: more than just another fat cell hormone?" Diabetes Care **26**(8): 2442-50.
- Chang, T. T., K. C. Young, et al. (1996). "Hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells: comparing acute and chronic hepatitis C virus infection." Hepatology **23**(5): 977-81.
- Chitturi, S., S. Abeygunasekera, et al. (2002). "NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome." Hepatology **35**(2): 373-9.
- Choo, Q.L., Kuo G.F., et al (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science **244**: 359-62.
- Di Bisceglie A.M., (1997) Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. Hepatology; **26**:S34-S38.
- Diez, J. J. and P. Iglesias (2003). "The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease." Eur J Endocrinol **148**(3): 293-300.
- Fain, J. N., A. K. Madan, et al. (2004). "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans." Endocrinology **145**(5): 2273-82.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." Nature **395**(6704): 763-70.
- Grundy, S. M., H. B. Brewer, Jr., et al. (2004). "Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." Circulation **109**(3): 433-8.
- Hezode, C., F. Roudot-Thoraval, et al. (2004). "Different mechanisms of steatosis in hepatitis C virus genotypes 1 and 3 infections." J Viral Hepat **11**(5): 455-8.
- Hotta, K., T. Funahashi, et al. (2001). "Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys." Diabetes **50**(5): 1126-33.
- Hu, E., P. Liang, et al. (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." J Biol Chem **271**(18): 10697-703.

- Hwang, S. J., J. C. Luo, et al. (2001). "Hepatic steatosis in chronic hepatitis C virus infection: prevalence and clinical correlation." J Gastroenterol Hepatol **16**(2): 190-5.
- Jonsson, J. R., A. R. Moschen, et al. (2005). "Adiponectin and its receptors in patients with chronic hepatitis C." J Hepatol **43**(6): 929-36.
- Katz, A., Nambi, S.S., et al (2000), "Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans", The J. of Clinical Endoc & Metabol, **85**(7): 2402-2410.
- Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2548-56.
- Kinlaw, W. B. and B. Marsh (2004). "Adiponectin and HIV-lipodystrophy: taking HAART." Endocrinology **145**(2): 484-6.
- Liu, C.H., et al (2005) , Serum adiponectin correlates with viral characteristics but not histologic features in patients with chronic hepatitis C, Journal of Hepatology **43**: 235–242.
- Lonardo, A., L. E. Adinolfi, et al. (2004). "Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease." Gastroenterology **126**(2): 586-97.
- Lord, G. M., G. Matarese, et al. (1998). "Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression." Nature **394**(6696): 897-901.
- Lyra, A. C., X. Fan, et al. (2004). "Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus." Braz J Med Biol Res **37**(5): 691-5.
- Maeda, K., K. Okubo, et al. (1996). "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)." Biochem Biophys Res Commun **221**(2): 286-9.
- Manzin, A., M. Candela, et al. (1994). "Presence of hepatitis C virus (HCV) genomic RNA and viral replicative intermediates in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells from HCV-infected patients." Clin Diagn Lab Immunol **1**(2): 160-3.
- Marchesini, G., M. Brizi, et al. (1999). "Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance." Am J Med **107**(5): 450-5.
- Marchesini, G., E. Bugianesi, et al. (2003). "Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome." Hepatology **37**(4): 917-23.
- Margetic, S., C. Gazzola, et al. (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(11): 1407-33.
- Matthews DR, Hosker JP, et al (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man". Diabetologia 1985; 28: 412-419
- Nakano, Y., T. Tobe, et al. (1996). "Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma." J Biochem (Tokyo) **120**(4): 803-12.
- Nolan, J. J., B. Ludvik, et al. (1994). "Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone." N Engl J Med **331**(18): 1188-93.
- Ortiz, V., M. Berenguer, et al. (2002). "Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression." Am J Gastroenterol **97**(9): 2408-14.
- Pagano, G., G. Pacini, et al. (2002). "Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association." Hepatology **35**(2): 367-72.



- Patton, H. M., K. Patel, et al. (2004). "The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients." J Hepatol **40**(3): 484-90.
- Poynard, T., P. Bedossa, et al. (1997). "Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups." Lancet **349**(9055): 825-32.
- Rubbia-Brandt, L., R. Quadri, et al. (2000). "Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3." J Hepatol **33**(1): 106-15.
- Saleh, M. G., C. J. Tibbs, et al. (1994). "Hepatic and extrahepatic hepatitis C virus replication in relation to response to interferon therapy." Hepatology **20**(6): 1399-404.
- Sanyal, A. J., C. Campbell-Sargent, et al. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities." Gastroenterology **120**(5): 1183-92.
- Scheen, A. J. and F. H. Luyckx (2003). "Nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance: interface between gastroenterologists and endocrinologists." Acta Clin Belg **58**(2): 81-91.
- Scherer, P. E., S. Williams, et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." J Biol Chem **270**(45): 26746-9.
- Shimizu, Y. K., H. Igarashi, et al. (1998). "Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture." J Gen Virol **79** ( Pt 6): 1383-6.
- Shimizu, Y. K., A. Iwamoto, et al. (1992). "Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5477-81.
- Simmonds, P. (2004). "Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on." J Gen Virol **85**(Pt 11): 3173-88.
- Uribe, M. and N. Mendez-Sanchez (2002). "[Hepatitis C in Mexico]." Rev Gastroenterol Mex **67 Suppl 2**: S7-8.
- Wajchenberg, B. L. (2000). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome." Endocr Rev **21**(6): 697-738.
- Wang, J. T., J. C. Sheu, et al. (1992). "Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells." J Infect Dis **166**(5): 1167-9.
- Wanless, I. R. and J. S. Lentz (1990). "Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors." Hepatology **12**(5): 1106-10.
- Willner, I. R., B. Waters, et al. (2001). "Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease." Am J Gastroenterol **96**(10): 2957-61.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." Nature **423**(6941): 762-9.
- Yoon, E. J. and K. Q. Hu (2006). "Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis." Int J Med Sci **3**(2): 53-6.
- Zaitoun, A. M., H. Al Mardini, et al. (2001). "Quantitative assessment of fibrosis and steatosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C." J Clin Pathol **54**(6): 461-5.
- Zekry, A., McHutchison, J G., Diehl A M., Insulin resistance and steatosis in hepatitis C virus infection, Gut 2005;54:903–906.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-32.