

Niveles séricos de interleucina 15, óxido nítrico e insulina en pacientes con infección crónica por virus de hepatitis C

Raúl Contreras-Omaña, M. Antonieta Xóchitl García-Samper, Roberto Bernardo-Escudero, y Luis Felipe Montaña-Estrada.

Autor para correspondencia

Dr. Raúl Contreras Omaña. Dirección: Hospital "INTERMÉDICA", Boulevard Luis Donaldo Colosio No 212 Fraccionamiento Arboledas de San Javier C.P. 42083. Teléfono: 771-184-02-48
Contacto al correo electrónico: drcontreras@hotmail.com

Palabras clave: Hepatitis C, hepatopatía crónica, Interleucina 15, insulina, óxido nítrico.

Keywords: chronic liver damage, hepatitis C, insulin, interleukin 15, nitric oxide.



Niveles séricos de interleucina 15, óxido nítrico e insulina en pacientes con infección crónica por virus de hepatitis C

Contreras-Omaña R^a, García-Samper MAX^b, Bernardo-Escudero R^c, Montaña-Estrada LF^d

Resumen

Introducción

En pacientes con infección crónica por virus de hepatitis C (VHC) la presencia de un estado inflamatorio crónico persistente podría estar asociado con niveles séricos elevados de óxido nítrico (NO) e insulina, que a su vez se presentarían de manera conjunta con cifras disminuidas de interleucinas proinflamatorias del tipo Th1 como la interleucina (IL)-15, indispensables para activar la inmunidad innata de tipo celular con el fin de limitar las infecciones virales intracelulares.

Objetivo

Determinar la correlación y nuevos vínculos fisiopatológicos que existen entre los niveles de IL-15, NO e insulina en pacientes con infección crónica por VHC previo a tratamiento antiviral.

Material y métodos

Se realizó un estudio, prospectivo, observacional, transversal, abierto, clínico, comparativo y aplicado durante el periodo de marzo a junio de 2009, en el que se analizaron muestras de 55 pacientes de ambos sexos con diagnóstico de infección crónica por VHC en el Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos del ISSSTE, con el fin de cuantificar los niveles de IL-15, NO e insulina. Los resultados se compararon entre sí, con el fin de determinar la existencia o no de relación entre los valores de cada uno de los elementos estudiados. Se realizó un análisis estadístico bivariado mediante la aplicación de la prueba T de Student.

Resultados

En la mayor parte de los pacientes estudiados los niveles de IL-15 se encuentran disminuidos o nulos, mostrando relación significativa en el análisis bivariado con los niveles séricos de NO ($p=0.003$) mediante aplicación de la prueba T de Student. Por el contrario, los niveles de insulina se encontraron dentro de rangos normales en casi todas las muestras y éstos no mostraron relacionarse con ninguna de las otras dos moléculas estudiadas.

Conclusión

En la mayor parte de los pacientes con infección crónica por VHC analizados en este estudio los niveles de IL-15 fueron indetectables, pudiendo explicar en parte la evolución del virus a la cronicidad, por otro lado, aunque los niveles séricos de insulina no mostraron relación con la IL-15, los niveles de NO sí van de la mano con la detección o no detección de esta citocina, lo que tal vez sugiere la presencia de un nexo fisiopatológico entre la producción de ambas moléculas, aunque se requiere de mayores estudios para establecer con más firmeza esta asociación.

Palabras clave: *hepatitis C, hepatopatía crónica, Interleucina 15, insulina, óxido nítrico.*

a. Clínica de Hígado, HGZMF 1 IMSS Pachuca, Hidalgo; Jefe de la Clínica de Investigación y Tratamiento de Enfermedades del Hígado, Hospital Intermédica, Pachuca, Hidalgo

b. Servicio de Gastroenterología, Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos ISSSTE, México DF

c. Asesor metodológico, Master en Ensayos Clínicos, Pachuca, Hidalgo

d. Laboratorio de Inmunobiología, UNAM, México DF

Autor para correspondencia:

Raúl Contreras Omaña. Dirección: Hospital "INTERMÉDICA", Boulevard Luis Donaldo Colosio. No 212 Fraccionamiento Arboledas de San Javier C.P. 42083. Teléfono: 771-184-02-48
Contacto al correo electrónico: drcontreras@hotmail.com

Serum levels of Interleukin 15, nitric oxide and insulin in patients with chronic Hepatitis C infection

Abstract

The present study analyzed blood samples from 55 chronic HCV infected patients from both sexes, with the aim of measuring serum levels of IL-15, Nitric Oxide and insulin, three molecules which are known to influence in a very important way the regulatory, immune and inflammatory pathways in the liver.

Once measurements were obtained, we proceeded to compare them with each other, searching to detect the presence or absence of a relationship between values. Our goal was to establish new possible physiopathological interactions that may lead to a better understanding of the disease.

As a result we obtained the following data: in most of the studied patients, the IL-15 levels were importantly diminished or absent, showing a significant relationship with the Nitric Oxide levels ($p=0.003$) in the bi-variable analysis. On the contrary, serum insulin levels were always found between normal values in almost all samples, and they didn't show a significant relationship with any of the other two molecules either.

Considering all the previous data, we reached the conclusion that in the majority of patients chronically infected with HCV in this study, the almost undetectable levels of IL-15 may in part explain the viral evolution to chronicity, and on the other hand, regardless of the normal serum insulin levels there was no correlation with IL-15 values. Nitric Oxide levels did show a significant relationship with the presence or absence of this cytokine. This may suggest the presence of a significant physiopathological nexus between production and manifestation of both molecules, although more studies to precisely establish this association are still needed.

Key words: Hepatitis C, interleukin 15, nitric oxide, insulin, chronic liver damage

Introducción

En pacientes con infección crónica por virus de hepatitis C (VHC) la presencia de un estado inflamatorio crónico persistente podría estar asociado con niveles séricos elevados de óxido nítrico (NO) e insulina, que a su vez se presentarían de manera conjunta con cifras disminuidas de interleucinas proinflamatorias del tipo Th1 como interleucina (IL)-15. Estas moléculas desempeñan un importante papel en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias en el tejido hepático que pueden ser determinantes para la evolución a cronicidad de la infección por VHC. Es bien conocido el papel que juega la IL-15 en la regulación de la respuesta celular inmune que impide la evolución a cronicidad de múltiples enfermedades virales y el NO es un poderoso regulador de la respuesta inflamatoria local y sistémica, quimiotaxis y control del flujo sinusoidal a nivel hepático. Finalmente, diversos genotipos de VHC, principalmente el 3 y en segundo lugar el 1, se han asociado con un hiperinsulinismo reactivo asociado a desregulación inmune e inflamatoria, cambios en el metabolismo de los lípidos, gluconeogénesis y depósito de grasa a nivel hepático asociado a sobreproducción de reactantes inflamatorios como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF 1) provocada por la presencia viral, que podría intensificar el daño hepático y facilitar la evolución a cronicidad de la infección, así como la presentación de complicaciones tardías como cirrosis y hepatocarcinoma. Así, niveles elevados de IL-15 serían protectores contra cronicidad en este grupo de pacientes, mientras que niveles elevados de NO e insulina se asociarían a una mayor intensidad en la respuesta inmune inflamatoria, mayor daño hepático y mayor posibilidad de cronicidad.

Material y métodos

Se llevó a cabo un estudio prospectivo-transversal, observacional, comparativo, abierto, clínico, y aplicado durante el periodo de marzo a junio de 2009, en una cohorte de 55 pacientes infectados por VHC del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos (HRLALM) del ISSSTE aceptados para protocolo de tratamiento antiviral con PEG-IFN α 2a o b asociado a ribavirina. Se utilizó una muestra a conveniencia, compuesta por un grupo de 55 pacientes con infección crónica por VHC bajo tratamiento en el HRLALM del ISSSTE que reunieron todos los criterios necesarios para el estudio. En estos pacientes se midieron niveles séricos de IL-15, de NO y de insulina (Kit comercial IL-15 *immunoassay* RD, Kit comercial NO *immunoassay* RD, medición de niveles de insulina por laboratorio central ISSSTE). Como testigo se utilizaron los valores de referencia considerados como normales por los laboratorios que diseñaron los reactivos utilizados. Estos niveles fueron comparados con los niveles control considerados normales, los valores predeterminados por el laboratorio que examinó las muestras, para posteriormente ser comparados entre sí. Al término del estudio, se buscó determinar si los niveles de IL-15, ON e insulina mostraron una relación en los pacientes con infección crónica por VHC. Se calculó la media de cada una de las variables y la comparación entre ellas se realizó mediante prueba T de Student. El análisis de los datos se realizó con el programa SPSS® versión 10.0.

Resultados

De la población estudiada ($n=55$), 20 pertenecen al sexo masculino (36.4%) y 35 al sexo femenino (63.6%), como se muestra en la tabla 1, cuyas edades oscilaron entre los 35 y los 65 años. Respecto a la medición de los niveles séricos de IL-

Tabla 1. Distribución de pacientes por sexo

Sexo	Frecuencia	Porcentaje	% valido	% acumulado
Masculino	20	36.4	36.4	36.4
Femenino	35	63.6	63.6	100
Total	55	100	100	

15: 44 pacientes (80%) tuvieron niveles negativos y/o no detectables, el resto fue positivo (n=11, 20%), como se observa en la gráfica 1.

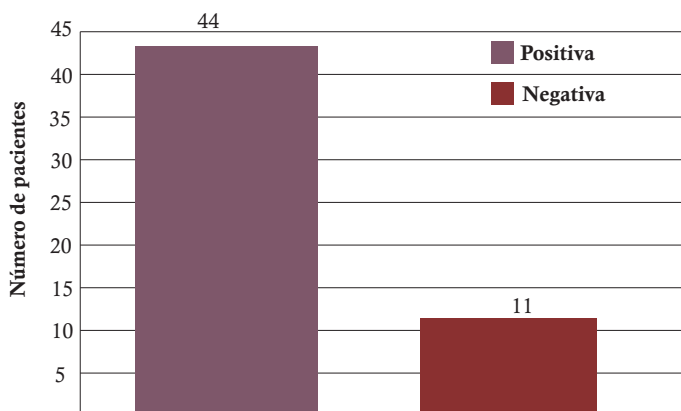
Tras cuantificar los niveles séricos de NO en todas las muestras, se encontró que 21 pacientes (38.2%) presentaron niveles dentro de rangos normales (cifra <5 mmol/ml), mientras que 34 pacientes (61.8%) mostraron niveles por arriba del límite normal y se muestra en la gráfica 2. Los niveles séricos de insulina se encontraron dentro de límites normales (<20 µU/ml) en 36 pacientes (65.5%), mientras que en 19 de las muestras (34.5%) esta reportaron niveles por arriba del límite superior normal como muestra la gráfica 3.

Al dividir los grupos tomando como variable independiente los niveles de IL-15, aquellos con niveles no detectables tuvieron niveles de NO de 7.49 mmol/ml, mientras que en aquellos que fueron detectables, la cifra promedio de NO fue de 16.50 mmol/ml como se observa en la tabla 2.

De la misma manera, al utilizar nuevamente IL-15 como variable independiente, el promedio de los niveles séricos de insulina en los pacientes con niveles de IL-15 indetectables fueron de 23.19 U/ml, mientras que en aquellos pacientes con niveles detectables, los niveles fueron de 30.64 U/ml, sin haber diferencia significativa entre ellos (Tabla 3).

Al realizar el análisis bivariado a los resultados mencionados mediante prueba T de Student, se encontró que los niveles séricos de insulina no se relacionan con la positividad o negatividad de IL-15 ($p=0.40$), por el contrario, una relación estadísticamente significativa entre la detección de IL-15 con los niveles séricos de NO ($p = 0.003$) sí fue detectada, la correlación se explica en la tabla 4.

Gráfica 1. Distribución de niveles de IL-15 (pg/ml)



Niveles séricos de IL-15, encontrando 44 pacientes con niveles negativos (no detectables) (80%) y 11 pacientes con niveles positivos (detectables) (20%)

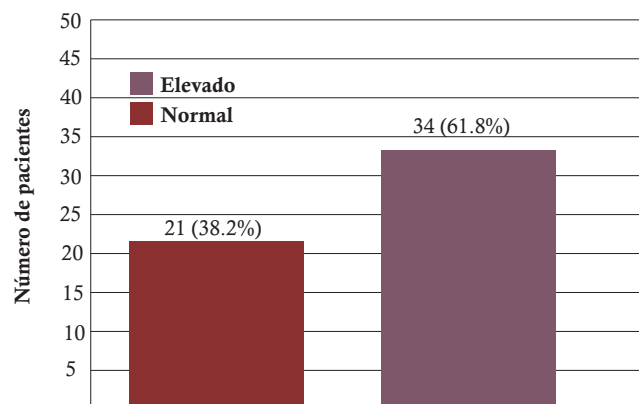
Discusión

En la literatura mundial son ya bien conocidas las alteraciones que presentan diversas citocinas y moléculas proinflamatorias en los pacientes con infección crónica por VHC.¹⁻¹⁸ Sin embargo, la mayoría de los estudios sólo han buscado comparar una misma variable entre dos grupos similares o relacionar un máximo de dos variables en esta población de pacientes.²⁻¹⁰ Las metas que persigue este estudio son, en primer lugar, determinar los valores séricos de tres moléculas que juegan un importante papel en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias en diversos tejidos y que se cree pueden ser determinantes para la evolución a cronicidad del VHC. En segundo lugar, se buscó encontrar una relación entre dichas variables, con el fin de descubrir posibles relaciones fisiopatológicas entre ellas y así proponer nuevas vías de investigación.

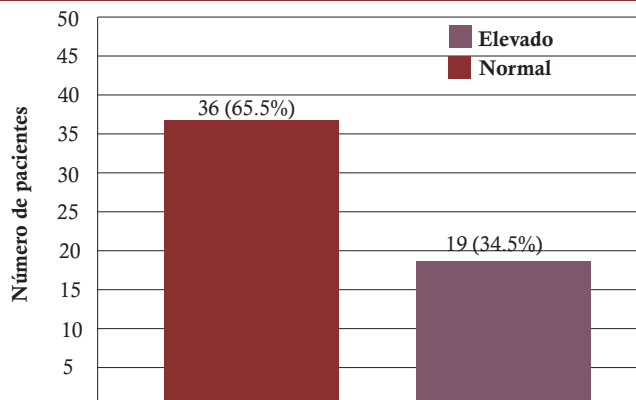
Como se esperaba, los niveles séricos de IL-15 en el mayor porcentaje de la población de pacientes con infección crónica por VHC se encuentran bajos o indetectables, lo que sirve como evidencia de una posible disfunción en los sistemas de inmunidad innata mediados por una respuesta Th1, llevando a una falla en la actividad celular de defensa y permitiendo la evolución de la infección hacia la cronicidad.¹¹⁻¹³

Por otro lado, los niveles de insulina en la mayoría de los pacientes se encontraron dentro de límites normales. Este hallazgo se contrapone con lo publicado por estudios similares que establecen que sobre todo en las mujeres infectadas por VHC los niveles de insulina tienden a elevarse, sirviendo como marcadores de un estado de resistencia sistémica y hepática probablemente desencadenado por el proceso inflamatorio viral.^{12,14} El mayor problema con esos estudios es que los pacientes que muestran niveles elevados de insulina también tienden a presentarse con cierto grado de sobrepeso y esteatosis hepática, lo que no permite determinar una verdadera relación causa-efecto entre ambos factores, es decir, si es el VHC el que provocó la resistencia a la insulina y a la larga llevó a sobrepeso y esteatosis, o si por el contrario es el sobrepeso previamente existente el que condicione la resistencia y una mayor inflamación hepática que puede

Gráfica 2. Distribución de niveles séricos de óxido nítrico (mmol/ml)



Se observa que 21 pacientes (38.2%) presentaron niveles dentro de rangos normales (considerados como una cifra menor a 5 mmol/ml), mientras que 34 pacientes (61.8%) mostraron niveles por arriba del límite normal.

Gráfica 3. Distribución de niveles séricos de insulina ($\mu\text{U/ml}$)

Límites séricos de insulina normales en 36 pacientes (65.5%), mientras que en 19 muestras (34.5%) por arriba del límite superior normal.

llevar a cronicidad y fibrosis la infección por VHC, siendo esta última la teoría más apoyada hasta el momento.

Los hallazgos más interesantes de nuestro estudio se relacionan con los niveles séricos de NO, ya que en forma inesperada se encontró que los pacientes que presentan actividad de IL-15 detectable son quienes muestran también los mayores niveles de NO, con una asociación significativa ($p = 0.003$) tras el análisis bivariado por T de Student. Una interpretación a estos hallazgos podría ser que la elevación de IL-15 desencadena una respuesta inflamatoria hepática persistente, inicialmente por inmunidad celular innata y posteriormente por linfocitos T de memoria.^{15, 16} Lo que a su vez provoca daño al endotelio y a los hepatocitos, tanto infectados como cercanos al sitio de inflamación, con posterior inducción de eNOS e iNOS, elevación en los niveles y consumo de arginina y finalmente sobreproducción de NO, mismo que a su vez puede perpetuar el proceso inflamatorio a través de la liberación de radicales libres de oxígeno,

Tabla 2. Niveles medios de óxido nítrico según IL-15

15 pg/ml		N	Mean	SD
IL-15 negativa	ON CON Valid N (listwise)	44	7.4990	6.4866
IL-15 positiva	ON CON Valid N (listwise)	11	16.5000	11.0349

Tabla 3. Niveles medios de insulina sérica según IL-15

15 pg/ml		N	Mean	SD
IL-15 negativa	INSUL Valid N (listwise)	44	23.1955	26.5466
IL-15 positiva	INSUL Valid N (listwise)	11	30.6455	25.3234

aumentando así el daño hepático tal como sucede en otras enfermedades como pancreatitis aguda o neoplasias hematológicas.^{17,18} Sin embargo, por el tamaño de nuestra muestra esto apenas puede ser una especulación y se requerirá de más investigación a este respecto para corroborar nuestros hallazgos y encontrar una explicación causal más completa.

Conclusiones

En la mayor parte de los pacientes con infección crónica por VHC analizados en este estudio los niveles de IL-15 se encontraron indetectables, lo que puede explicar en parte su evolución a cronicidad. Por otro lado, aunque los niveles séricos de insulina no mostraron relación con la IL-15, los niveles de NO sí van de la mano con la detección o no detección de esta citocina, lo que puede sugerir la presencia de un nexo fisiopatológico entre la producción de ambas moléculas, aunque se requiere de mayores estudios para establecer con más firmeza esta asociación.

Tabla 4. Análisis bivariado de IL-15 con NO e insulina mediante prueba T de Student

		Prueba de igualdad de varianzas de Levene			Prueba T de igualdad de medias					
		F	Sig	t	df	Sig	Diferencia de media	Diferencia de error estándar	Diferencia de Intervalo de confianza 95%	
									Inferior	Superior
INSULINA	Varianzas iguales supuestas	1.395	.243	-.841	.243	53	-.14	.16	-.46	.19
	Varianzas iguales no supuestas			-.789		14.346	-.14	.17	-.51	.23
NO	Varianzas iguales supuestas	5119.800	.000	-3.111	.000	53	-.48	.15	-.78	-.17
	Varianzas iguales no supuestas			-0.200		43.000	-.48	7.62E-02	-.63	-.32

Referencias bibliográficas

- Guillou-Guillemet H Le *et al*; "Genetic diversity of the Hepatitis C Virus: Impact and issues in the antiviral therapy"; *World J Gastroenterol*. 2007;13(17):2416-2426
- Joerg Timm, Michael Roggendorf; "Sequence diversity of Hepatitis C Virus: Implications for immune control and therapy"; *World J Gastroenterol*. 2007;13(36):4808-4817
- Henry Radziejewicz *et al*; "Memory CD8+-T cell differentiation in viral infection: a cell for all seasons". *World J Gastroenterol* 2007;13(36):4848-4857
- Medicina Molecular de FIBAO: "Interferón gamma". 2007-10-16. www.medmol.es
- Ute-Christiane Meier *et al*; "Shared Alterations in NK Cell Frequency, Phenotype, and Function in Chronic Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections". *Journal of Virology*. 2005;12365-12374
- Ursula Plöckinger MD, *et al*; "Hepatitis-C Patients Have Reduced Growth Hormone (GH) Secretion Which Improves During Long-Term Therapy With Pegylated Interferon-alfa. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:2724-2731
- Richard Fischer *et al*; "Hepatitis C virus infection and apoptosis". *World J Gastroenterol* 2007;13(36):4865-4872
- Elaine F. Meurs, Adrien Breiman; "The Interferon Inducing Pathways and the Hepatitis C Virus"; *World J Gastroenterol*. 2007; 13(17): 2446-2454
- Friedemann Weber; "Interaction of hepatitis C virus with the type I interferon system". *World J Gastroenterol* 2007 September 28; 13(36): 4818-4823
- Izzo F. *et al*; "Pegylated arginine deaminase lowers hepatitis C viral titers and inhibits nitric oxide synthesis". *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Jan; 22(1) 86-91
- Strickler HD *et al*; "The Insulin-like growth factor axis and the risk of liver disease in Hepatitis C Virus/HIV co-infected women". *AIDS* 2008;22(4):527-531
- Francesco Negro, Mahnaz Alaei; "Hepatitis C Virus and type 2 diabetes". *World J Gastroenterol*. 2009; 15(13): 1537-1547
- Burton JD, Bambford RN *et al*; "A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukaemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells". *PNAS*. 1994;91:4935-4939
- Grabstein KH *et al*; "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor". *Science*. 1994;264:965-968
- Alicia Santos Savio; "Interleucina-15: una citocina relevante en la homeostasis linfocítica y en enfermedades autoinmunes". *Biotechnología Aplicada*. 2006;23:79-86
- Vincenzo Barnaba; "Hepatitis C virus infection: A 'liaison a trois' amongst the virus, the host, and the chronic low-level inflammation for human survival". *Journal of Hepatology* 210, vol. 53; 752-761
- Ueda T *et al*; "Serum interleukin-15 level is a useful predictor of the complications and mortality in severe acute pancreatitis". *Surgery* 2007;142(3):319-326
- Pappa C *et al*; "Serum levels of interleukin-15 and interleukin-10 and their correlation with proliferating cell nuclear antigen in multiple myeloma". *Cytokine* 2007;37(2):171-175