

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD MONTERREY

**Análisis in silico de la respuesta inmune en hepatocitos
infectados por el virus de la hepatitis C**

TESIS QUE PRESENTA:

Mauricio Castaño Arcila

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias
en Ingeniería y Física Biomédicas**

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González

Apodaca, Nuevo León, México

Agosto de 2015

Resumen

El virus de la hepatitis C (VHC) es la principal causa de enfermedades crónicas del hígado. La etapa aguda de la infección es usualmente asintomática y la persistencia en la mayoría de los individuos infectados conlleva a la hepatitis crónica, cirrosis hepática y finalmente a carcinoma hepatocelular. Con el fin de evitar los estados crónicos o más avanzados de la enfermedad, la célula al detectar el VHC activa una respuesta inmune mediada por el interferón (IFN), dicho interferón es liberado por los hepatocitos infectados y por células centinelas circundantes. Muchos genes estimulados por interferón (ISG) se han reportado, pero recientemente se ha detectado que solo 7 de ellos presentan una respuesta anti VHC significativa. Es por esto que para investigar la capacidad que tiene el VHC de generar la biestabilidad en la red de señalización, en este trabajo se desarrolló un modelo matemático simplificado, en el cual se analizó y se determinó que es posible lograr la eliminación del virus del VHC modificando la concentración de las 7 proteínas ISG involucradas. En la primera sección de esta tesis se partió de un modelo determinista previamente reportado, se simplificó para considerar las especies químicas de nuestro interés conservando la dinámica del sistema y se validó con datos experimentales publicados con anterioridad. Posteriormente se buscó la concentración de las proteínas ISG a la cual la célula asegura su limpieza. Este análisis se realizó mediante los diagramas de bifurcación modificando las tasas de producción y degradación de las proteínas ISG una a una. Se determinó que la proteína IFITM1 es la que presenta mayor impacto en la respuesta global del sistema ante pequeñas variaciones comparada con las restantes y que su sobreexpresión lleva al sistema a un estado de limpieza. Se planteó un nuevo sistema con la proteína IFITM1 sobre expresada y se evaluó su robustez variando las proteínas restantes, se encontró que la biestabilidad solo es posible ante la variación de las proteínas IFIT3 e IFITM3.

Con el fin de determinar el impacto del ruido intrínseco de la red de señalización se elaboró un modelo estocástico y se validó comparándolo con el modelo determinista, esto debido a que la dinámica determinista es un promedio de las simulaciones estocásticas. Se simuló bajo las mismas condiciones y encontró que presenta bimodalidad para condiciones normales de la red de señalización, esto es análogo a la biestabilidad en el análisis determinista. Para la sobreexpresión de IFITM1 se logra una limpieza de entre 95.8% y 99.8% independiente si se está en etapa aguda o etapa crónica de la infección por VHC.

Abstract

The Hepatitis C Virus (HCV) is the main cause of liver chronic diseases. The acute stage of infection is usually asymptomatic and persistence in most of the infected individuals leads to chronic hepatitis, hepatic cirrhosis and finally hepatocellular carcinoma. In order to avoid the chronic or advanced stages of this disease, when HCV is detected, cells activate an immune response mediated by interferon (IFN), interferon is released by the infected hepatocytes and surrounding sentinel cells. Many genes stimulated by interferon (ISG) have been reported, but recently it has been detected that only seven of them show a significant anti-HCV response; Hence in order to evaluate the bistability generating characteristic of HCV in the signaling network, this project developed a simplified mathematical model, which were analyzed and was determined that it is possible to accomplish HCV eradication by modifying seven of the ISG protein involved. In the first section on this thesis, we took a previously reported deterministic model, we simplified it in order to consider the chemical species included in our interests, keeping the system dynamics and validated it with published experimental data. Furthermore, we found the ISG protein concentrations which makes cells assure clearance. This analysis was made using bifurcation diagrams modifying ISG proteins production and decay rates. It was determined that IFITM1 protein is the one representing a higher impact on the overall system response, only with fine variations, in contrast with the other proteins. Also, its over-expression leads the system to a clearance state. We proposed a new system with an over-expressed IFITM1 protein and we evaluated its robustness by varying the other proteins involved; we found that bistability is only possible by varying IFIT3 and IFITM3 proteins.

Concerning determine the impact of intrinsic noise in the signaling network, we made a stochastic model, which we validated it by comparing it with the deterministic model, this because we consider the deterministic model being the average of several stochastic simulations. We simulated it under the same conditions than the deterministic model and found that it shows bimodality for normal conditions in the signaling network, analogous to the bistability analysis with the deterministic model. For IFITM1 over-expression clearance is accomplished (between 95.8% and 99.8%), regardless of being in acute stage or chronic stage of HCV infection.

“Mathematics is the language
with which God wrote
the Universe.”
-Galileo Galilei

Agradecimientos

A mi madre, Luz Dary Arcila, por todo el apoyo durante mi vida, sus consejos y reprimendas que me han permitido ser mejor persona, por enseñarme que si se puede si te lo propones y luchas por ello. A mis hermanas Paula Andrea Castaño Y Daniela Castaño quienes son mis confidentes y cómplices de travesuras, por todas sus peleas que me han hecho más tolerante. A mi papá por ser mi padre. A mi esposa, María Isabel Pérez, por dedicar su vida a nuestro proyecto de vida, por compartir un sueño de estar juntos hasta el fin de nuestros días y con quien puedo reír y llorar de tristeza y alegría.

A mi asesor el Dr. Jesús G. Rodríguez, por su constante apoyo en la realización de este proyecto, por confiar en mí, soportarme durante más de un año y estar presto ante cualquier duda siempre con la intención de ayudar. Al Dr. Daniel P. Sánchez quien me brindó su apoyo de manera incondicional, de manera profesional y personal. Al Conacyt, por contribuir económicamente con una beca y permitirme llevar a cabo mis estudios de maestría. Al CINVESTAV Monterrey, a todos y cada uno de los doctores y a los trabajadores por permitirme estar a su lado brindándome conocimiento y lecciones de vida.

A mis Amigos quienes son la familia que uno puede elegir, a todos ellos quienes fueron, son y serán mi familia lejos de casa. A mis compañeros de generación por nuestros buenos y no tan buenos momentos.

Contenido

Resumen	I
Abstract.....	II
Agradecimientos	IV
Contenido	1
Lista de figuras	3
Lista de Tablas	4
Marco teórico	5
1.1 Virus de la hepatitis C	5
1.2 Características del virion.....	7
1.3 Ciclo de vida del VHC.....	7
1.4 Infección por el VHC	9
1.4.1 Hepatitis C aguda.....	9
1.4.2 Hepatitis C crónica.....	10
1.5 Respuesta del sistema inmune innato	11
1.6 Interacción entre el virus-célula	13
Hipótesis y objetivos.....	17
1.7 hipótesis.....	17
1.8 Objetivo principal.....	17
1.9 Objetivos particulares.....	17
Método.....	18
1.10 Desarrollo de los modelos matemáticos	18
1.10.1 Modelo determinista.....	18
1.10.2 Modelo estocástico	28
Resultados y discusión	31
1.11 modelo determinista.....	31
1.11.1 Infección del hepatocito sin respuesta del sistema inmune	31

1.11.2	Variación temporal en la respuesta del sistema inmune en hepatocitos con VHC	32
1.11.3	Diferentes dosis de interferón en hepatocitos infectados por el VHC.....	34
1.11.4	Biestabilidad.....	35
1.11.5	Estados estacionarios al variar la tasa de expresión del mRNA.....	36
1.11.6	Diagrama de bifurcación con la sobreexpresión de VmIFITM1	39
1.11.7	IFITM1 como proteína anti-VHC.....	41
1.12	Modelo estocástico.....	42
1.12.1	Hepatocitos infectados por el VHC y respuesta inmune (IFN).....	42
1.12.2	Sobreexpresión de VmIFITM1 en Hepatocitos con respuesta inmune (IFN) bajo la infección del VHC.....	44
1.12.3	Modificación de tasas de producción y degradación para ARNm y proteínas.	47
	Conclusiones.....	49
	Perspectivas.....	51
	Referencias	52
	Anexos	56

Lista de figuras

Figura 1 Genoma del VHC.....	6
Figura 2 Virion.....	7
Figura 3 Ciclo de vida VHC.....	8
Figura 4 Desarrollo clínico del VHC.	11
Figura 5 Vía de señalización JAK-STAT.	13
Figura 6 Interacción entre el virus y la membrana plasmática.....	14
Figura 7 Red de señalización del hepatocito infectado con el VHC.	16
Figura 8 Diagrama de bloques para el análisis determinista.....	27
Figura 9 Diagrama de bloques para el análisis estocástico.....	30
Figura 10 Dinámica del virus sin Interferón en hepatocitos.....	32
Figura 11 Interferón a diferentes tiempos pos infección.....	33
Figura 12 Cultivos tratados a diferentes tiempos pos infección.....	33
Figura 13 Diferentes dosis de interferón.....	34
Figura 14 células tratadas con diferentes dosis de interferón.....	35
Figura 15 Puntos de equilibrio.	36
Figura 16 Puntos de equilibrio para diferentes valores de <i>VmIFITM1</i>	37
Figura 17 Diagrama de bifurcación de las ISG.....	38
Figura 18 Diagramas de bifurcación de los ARNm y las proteínas ISG.....	39
Figura 19 Diagrama de bifurcación <i>VmIFITM1</i> modificado.....	40
Figura 20 Transfección ISG56 o IFITM1.....	41
Figura 21 Distribución bimodal.	43
Figura 22 Simulación carga viral baja.	45
Figura 23 Simulación carga viral alta.	45
Figura 24 Distribución monomodal.....	46
Figura 25 Modificación de tasas de producción y degradación en ARNm y proteínas.....	48
Figura 26 Diagrama de bifurcación IFITM1.....	56
Figura 27 Diagramas de bifurcación ARNm ISG.....	57
Figura 28 Diagramas de bifurcación Proteína ISG.....	58

Lista de Tablas

Tabla 1. Parámetros del modelo determinista.....	26
Tabla 2. Sistema de reacciones y propensiones.....	30

Marco teórico

1.1 VIRUS DE LA HEPATITIS C

El virus de la hepatitis C o VHC es la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC) a nivel mundial. Hoy en día no existe una vacuna disponible y las opciones terapéuticas son limitadas. Actualmente el tratamiento terapéutico estándar es el interferón- α pegilado, sin embargo, es difícilmente tolerado y solo se obtiene respuesta antiviral sostenida en un 50% de los pacientes; como consecuencia el número de pacientes con secuelas de la hepatitis C crónica, incluido el CHC, tiende a aumentar significativamente en los próximos años.

El virus de la hepatitis C fue inicialmente aislado del plasma de una persona con hepatitis no-A no-B en el año 1989 (Choo, Kuo, Weiner, Overby, & Bradley, 1989), para ese entonces el virus era el responsable de al menos 90% de los casos conocidos como hepatitis no A no B.

El VHC es clasificado en la familia de los flaviviridae en el género de los hepacivirus, la cual incluye a su vez algunos otros virus como los responsables de la fiebre amarilla y el dengue. El virus de la hepatitis C se replica en el citoplasma de los hepatocitos, pero no es directamente citopático. El estado persistente de la infección aparece como una rápida producción del virus y una continua propagación de célula a célula unido a una pobre respuesta de las células T. El VHC tiene una hebra positiva de ARN como su material genético con una longitud de 9.6kb y está compuesto de una región 5' no codificante (NCR), la cual incluye un sitio de entrada ribosomal interno (IRES), un marco abierto de lectura que codifica las proteínas estructurales y no estructurales y una 3' NCR. Las proteínas estructurales que forman la partícula viral son, las proteínas del núcleo y las glicoproteínas de envoltura E1 y E2. Las proteínas no estructurales incluyen el canal iónico p7, la proteasa

NS2-3, la serín proteasa, la ARN helicasa, el polipéptido NS4A, las proteínas NS4B, NS5A y la ARN polimerasa NS5B ARN-dependiente (RdRp).

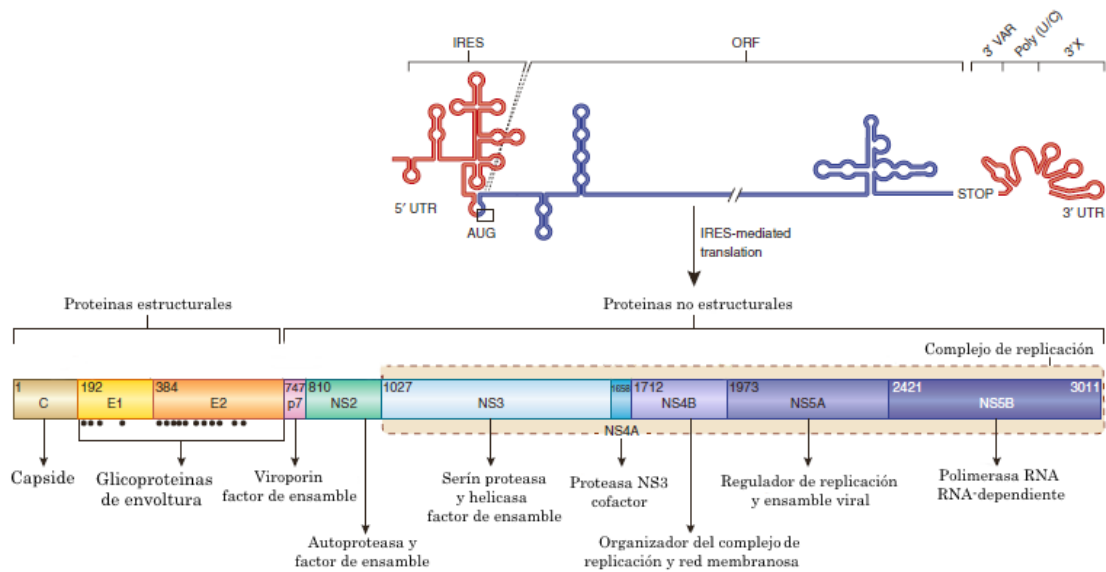


Figura 1 Genoma del VHC.

Organización del genoma del virus de la hepatitis C con sus correspondientes longitudes en pares de bases (Scheel & Rice, 2013).

La infección del virus de la hepatitis C es un proceso altamente dinámico con un ciclo de vida media de solo un par de horas y la producción y limpieza se estima en 10^{12} viriones por día en un individuo dado (Neumann, Nancy P., Harel, & David R., 1998). Esta alta tasa de actividad en la replicación, combinado con la ausencia de una función de corrección de la RdRp del virus, es la base de la alta variabilidad genética del VHC.

El VHC aislado puede ser clasificado en genotipos y subtipos. Hay 6 sub-genotipos principales que difieren en su secuencia genómica entre un 30 y un 35%. Pacientes infectados con el genotipo 1 no responden muy bien ante las terapias a base de interferón-alfa en relación a los pacientes infectados con los genotipos 2 o 3 (Neumann, Nancy P., Harel, & David R., 1998).

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRION

Los viriones del VHC envueltos miden 50-80 nm de diámetro, poseen las glicoproteínas E1 y E2 embebidas en la bicapa lipídica circundante a la nucleocápside. La nucleocápside está compuesta de un núcleo proteico y el material genético, el cual es un ARN monocatenario positivo. Los viriones del VHC existen como lipovirionpartículas (LVPs) y están asociados con las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) lo cual les sirve de escudo protector para no ser neutralizados en el torrente sanguíneo (Ralf Bartenschlagere, 2011) (Scheel & Rice, 2013).

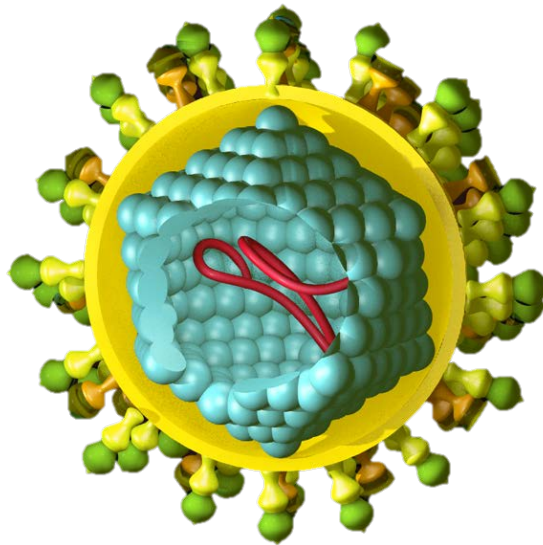


Figura 2 Virion.

De color verde y amarillo en la periferia se representan las glicoproteínas E1 y E2 respectivamente, y se aprecia el material genético en el interior de la nucleocápside (<http://www.med-ars.it/>, 2015).

1.3 CICLO DE VIDA DEL VHC

El VHC solo infecta a humanos y chimpancés. Los hepatocitos son el principal blanco del virus pero también se ha detectado infección de células B y células dendríticas entre otras.

Se han propuesto algunos receptores del VHC, entre ellos están: CD81, la proteína tetraspanin que se encuentra en la superficie de muchos tipos celulares incluyendo los hepatocitos, los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), los receptores scavengers clase B tipo-1 (SR-BI) y más recientemente Claudin-1 (Piero, et al., 1998), (Agnello, Ábel, Elfahal, Knight, & Zhang, 1999) (Scarselli, et al., 2002) (Evans, et al., 2007)

Aun no se ha detectado por medio de que receptores se induce la endocitosis pero la internalización del virus es por medio de esta vía. El virion se une a la membrana del hepatocito e internaliza la cápside. Mediante la decapsidación es liberado el material genético, el cual se traduce en el retículo endoplásmico rugoso directamente, la proteína NS4B induce la formación de vesículas membranosas en una zona que recibe el nombre de red membranosa que usualmente está entre el retículo endoplásmico rugoso y el núcleo, esta red se presume que le sirve al virus como un complejo estructural para la replicación y posterior ensamblaje de las nuevas partículas víricas. Las nuevas partículas víricas son liberadas o salen de la célula usando la vía secretora constitutiva hasta llegar a la membrana plasmática y por exocitosis son liberadas al medio extracelular para infectar a otras células (ver Figura 3).

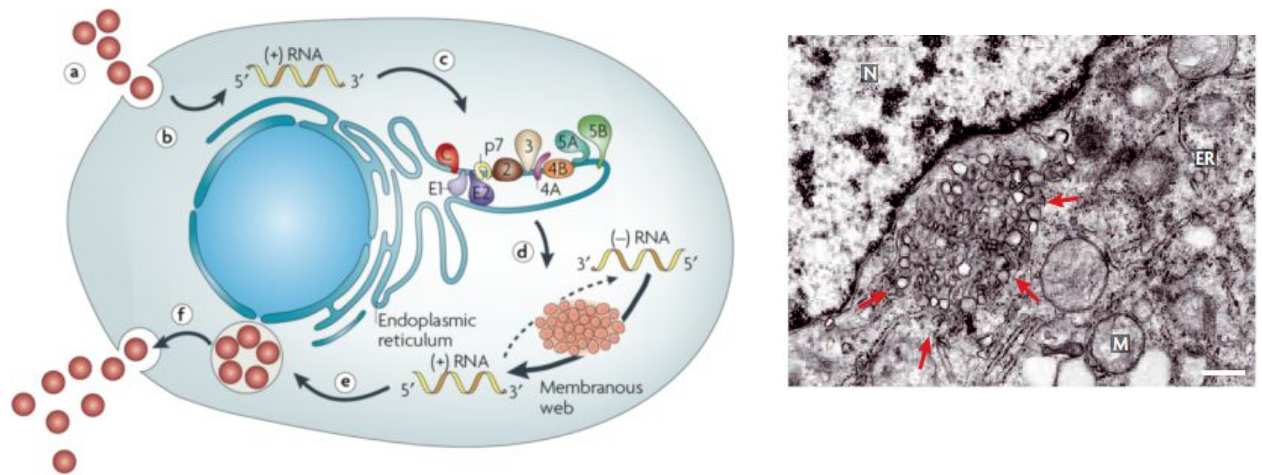


Figura 3 Ciclo de vida VHC.

Izquierda: Unión del virus e internalización(a), decapsidación y liberación material genético al citoplasma (b), traducción mediada por IRES y procesamiento de poliproteínas (c), Replicación del ARN (d), empaquetamiento y ensamblaje (e), maduración del virion y liberación al medio extracelular (f). Derecha: imagen de la red membranosa escala 500nm (Moradpour, Penin, & Rice, 2007).

1.4 INFECCIÓN POR EL VHC

La mayoría de los pacientes con hepatitis C crónica son asintomáticos o presentan síntomas no específicos tales como fatiga o malestar. El diagnóstico del VHC está basado en la detección de anticuerpos anti-VHC y niveles de ARN del VHC en sangre, también se determina la tipología y se cuantifican los niveles del VHC.

Las consideraciones para el tratamiento de la hepatitis C están basadas en la etapa de infección, aguda o crónica, así como en la coinfección (con el virus de la inmunodeficiencia adquirida o hepatitis B) y la comorbilidad. La principal meta de los tratamientos es lograr una respuesta viral sostenida (SVR), la cual se define como la ausencia o no detección del virus en la sangre por lo menos durante los últimos 6 meses después de retirar el tratamiento. Un tratamiento estándar de 48 semanas tiene un costo de alrededor de 30.000 a 40.000 USD (Hoofnagle & Seeff, 2006) pero cada paciente es evaluado individualmente con respecto a sus coinfecciones.

1.4.1 Hepatitis C aguda

El virus de la hepatitis C es detectable en el plasma dentro de un periodo que va de los siete a los 21 días post-infección, sin embargo largos periodos de incubación pueden presentarse, en especial en los casos en que la carga viral transmitida es baja. Este tipo de información sugiere que el tiempo de incubación puede variar entre las diferentes rutas de transmisión.

Los niveles de ARN del VHC incrementan rápidamente después de la infección seguida por un incremento de las alanina aminotransferasas (ALT) entre las cuatro y 12 semanas, lo cual es un indicador de que hay daño a nivel hepático (Bertoletti & Ferrari, 2003). Algunos pacientes presentan síntomas clínicos entre las dos y 12 semanas pero sigue siendo la gran mayoría de pacientes quienes no presentan síntomas por lo cual en esta etapa es muy poco

probable que los individuos infectados tengan algún tipo de cuidado. Debido a esto las etapas más tempranas de la enfermedad son poco estudiadas.

En algunos pacientes la infección es autolimitada y se convierte en indetectable por largos periodos antes de entrar en infección aguda, sin embargo, la eliminación o limpieza del virus se da en porcentajes muy bajos en los pacientes. Entre el 54 y 86 % de los pacientes presentan una infección crónica. La infección crónica del VHC se define como la persistencia de la enfermedad luego de 6 meses desde la transmisión.

1.4.2 Hepatitis C crónica

Una vez la infección crónica es establecida, la eliminación espontánea del virus es muy poco común. La hepatitis C crónica causa daño constante al hígado resultando en cirrosis y eventualmente en carcinoma hepatocelular. Una consecuencia de la enfermedad es la necrosis y la inflamación del hígado. La mayoría de los pacientes con hepatitis C crónica (CHC) desarrollan algún tipo de fibrosis hepática, entre el 15% y 52% de ellos desarrollará cirrosis en un lapso de 10 a 40 años, sin embargo la cirrosis hepática es un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma hepatocelular, la rápida cicatrización, la descompensación propia de la cirrosis en conjunto al carcinoma hepatocelular, son la principal causa de muerte en las etapas terminales de la hepatitis C crónica.

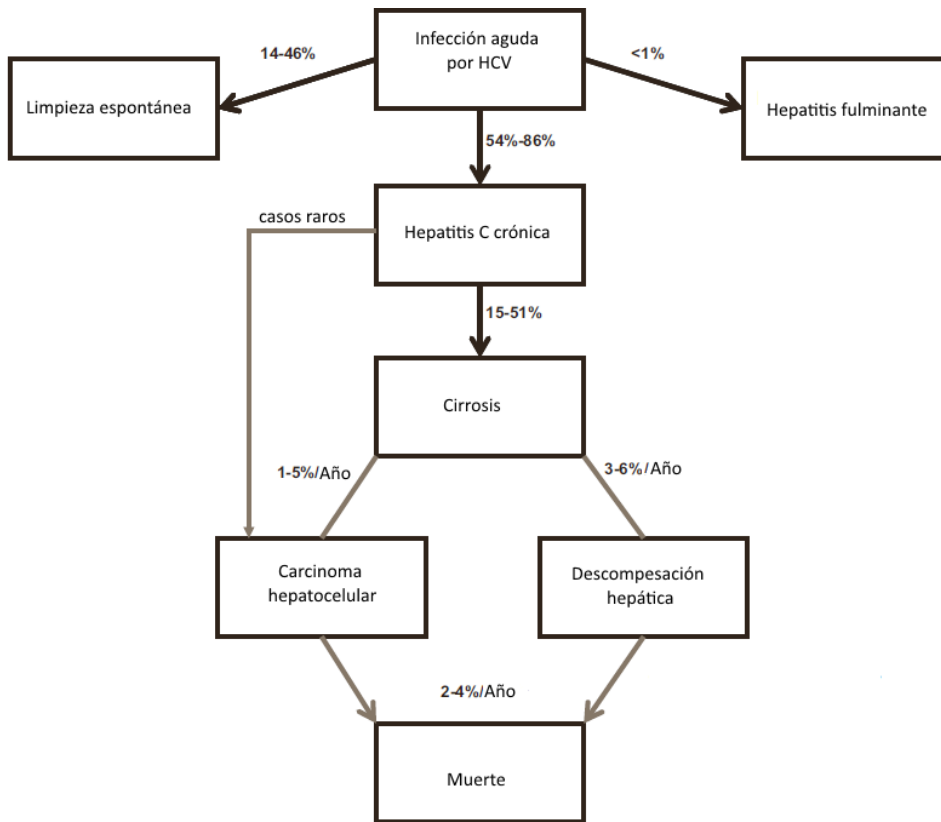


Figura 4 Desarrollo clínico del VHC.

(Maasoumy & Wedemeyer, 2012).

1.5 RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE INNATO

Las respuestas del sistema inmune innato son las primeras líneas de defensa de las células ante la infección por virus y los interferones son las citosinas responsables tanto de la inducción del estado antiviral de las células como también de la activación de los componentes del sistema inmune, como lo son las células NK (natural killers). El interferón tipo I es producido por las células infectadas por el virus y por las células centinelas del sistema inmune tales como macrófagos y células dendríticas. Todos los receptores de interferón actúan a través de la vía de señalización JAK-Stat (Janus Kinase (JAK)-

transductor de señal y activador de transcripción (STAT)) que transmite las señales desde la superficie de la célula hasta el núcleo y estimula la expresión de genes específicos.

El sistema de estimulación por el interferón está dado por dos etapas una temprana y una tardía. La temprana se caracteriza por un incremento de la carga viral en los primeros días pos-infección la cual se estabiliza por varias semanas, esto se debe a la ausencia de la respuesta inmune adaptativa por parte de las células T, durante esta etapa tampoco hay señales bioquímicas que indican un daño hepático y no dura más de 6 a 8 semanas después de la infección. En la etapa tardía hay una respuesta inmune en el hígado debido al incremento en las enzimas indicadoras de daño hepático y las ISG son fuertemente inducidas en este periodo, siendo inefectivas para limpiar el virus en la mayoría de los casos; por consiguiente se llega a una infección crónica en el sistema por el virus de la hepatitis C en un periodo no mayor a los 24 meses.

La unión del interferón a sus receptores activan proteínas cinasas específicas de la familia JAK que luego fosforilan tirosinas libres en los dominios intracelulares de los receptores de interferón (Darnell , 1997). El interferón tipo I induce homodímeros que se unen a elementos de secuencias gamma activadas en los genes estimulados por interferón, adicionalmente induce la formación del factor de transcripción heterotrimérica ISGF3 (Interferon-stimulated gene factor 3), conformado por la unión de STAT1, STAT2 y IRF9 el cual se puede unir a elementos de respuesta a estimulación por interferón (Interferon-sensitive response element, ISRE).

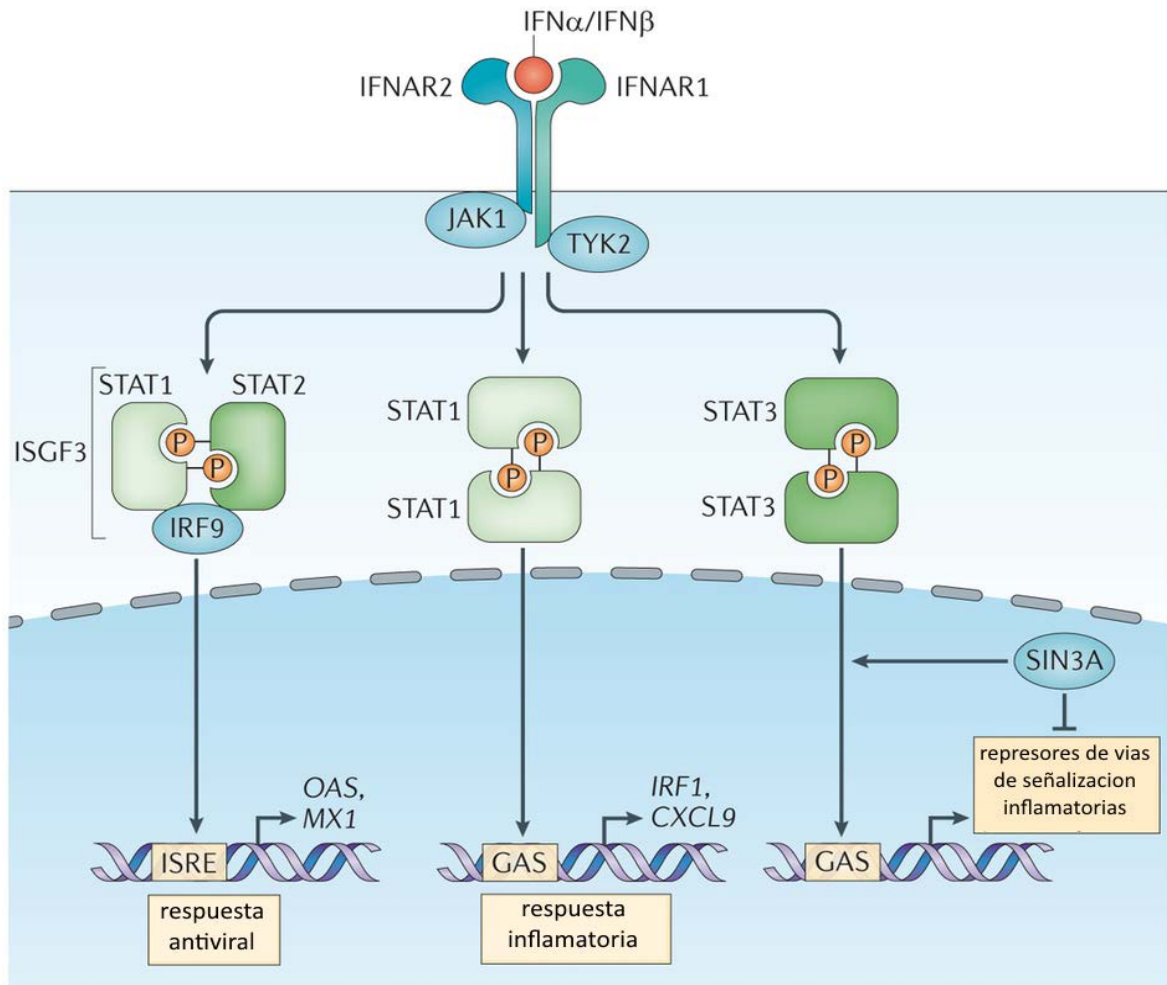


Figura 5 Vía de señalización JAK-STAT.

En la unión, el receptor al interferón- α (IFNAR compuesto de dos subunidades IFNAR1 e IFNAR2) activa la vía de señalización Janus Kinase 1 (JAK1) y tirosina quinasa 2 (TYK2). Fosforilación de los receptores por estas cinasas resulta en el reclutamiento de STAT. Los tres complejos predominantes que son formados en respuesta al interferón tipo I controlan distintos programas de expresión de genes. El complejo del gen estimulado por interferón factor-3 (unión de STAT1, STAT2 e IRF9) activa los genes antivirales clásicos, mientras los homodímeros se unen a las secuencias activadas por gamma (GASs) para inducir los genes pro-inflamatorios, los homodímeros STAT3 indirectamente suprimen la expresión de genes pro-inflamatorios (Ivashkiv & Donlin, 2013).

1.6 INTERACCIÓN ENTRE EL VIRUS-CÉLULA

Desde el momento en que la célula entra en contacto con el virus por medio de sus receptores en la membrana celular, se desencadenan diferentes procesos que varían en sus

escalas temporales. A partir de la reciente habilidad de tener sistemas celulares basados en hepatocitos humanos primarios inmortalizados se logró describir el ciclo de vida del VHC (Figura 3) (Chevaliez & Pawlotsky., 2006) y se han podido elucidar muchos de los mecanismos e interacciones entre la célula y el virus. En la Figura 6 se aprecia el modelo actual de entrada del VHC en los hepatocitos en donde las partículas circundantes del VHC son asociadas con lipoproteínas de baja y muy baja densidad, se une en primera estancia a los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), posteriormente a glicosoaminoglicano (GAG), receptores scavengers clase B tipo 1 (SR-B1) y finalmente a las proteínas tetraspanina CD81 y claudin 1 (CLDN1) que son las encargadas de inducir la endocitosis.

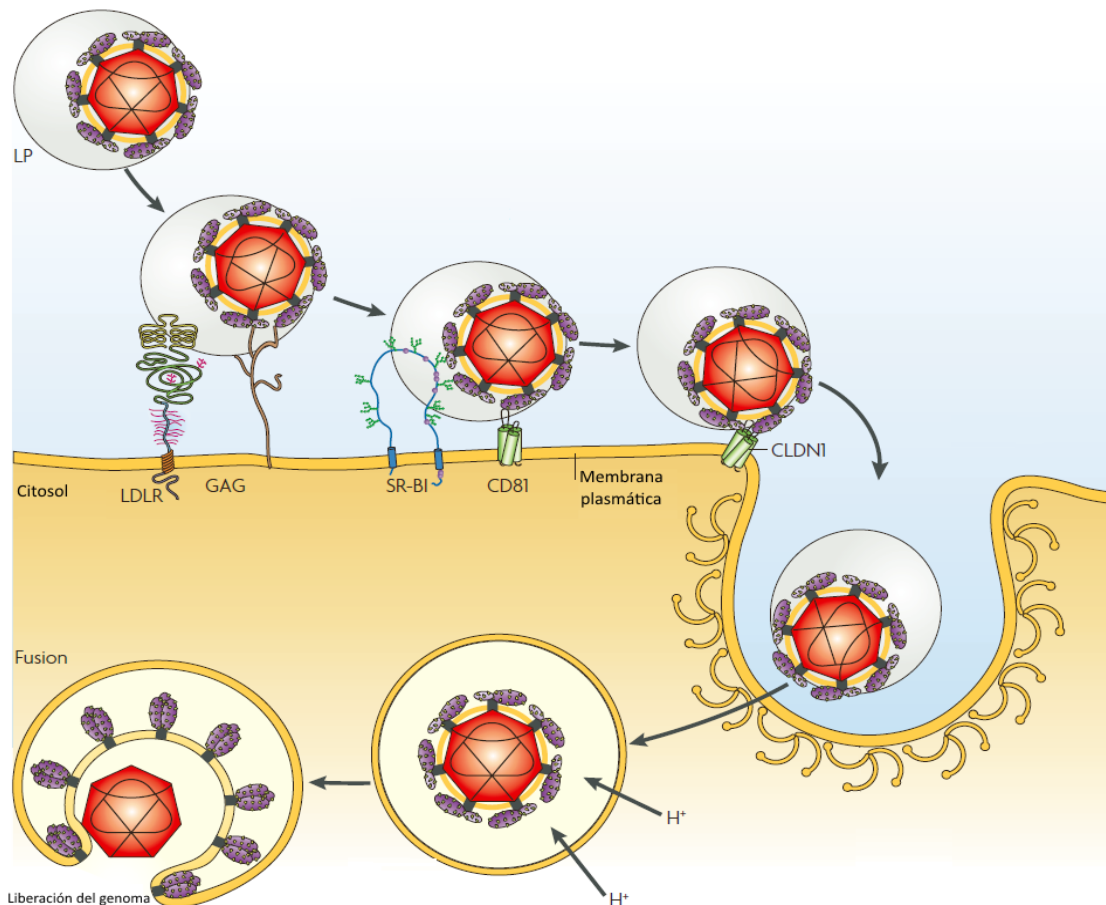


Figura 6 Interacción entre el virus y la membrana plasmática.

Modelo actual de entrada del VHC en los hepatocitos. (Moradpour, Penin, & Rice, 2007).

La vía de señalización mediada por el interferón para producir proteínas con actividad anti-VHC en la célula infectada descrita previamente, resulta en la producción de diversas, proteínas que actúan en diferentes etapas del ciclo de vida del VHC. Estas proteínas se sintetizan a partir de la transcripción y la traducción de los genes estimulados por el interferón (Proteínas ISG). Experimentalmente se ha validado que las proteínas sintetizadas a partir de los genes estimulados por el interferón interfieren en la transcripción y traducción del VHC, entre estos genes están descritos los siguientes : IFIT3 (Proteína inducida por interferón con repetidos de tretratricopeptido 3) (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013) (Raychoudhuri, et al., 2011), TRIM14 (proteína que contiene motivos tripartita 14) (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013), PLSCR1 (proteína mezcladora de fosfolípidos 1) (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013), IFITM1 (proteína transmembranal 1 inducida por interferón) (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013) (Raychoudhuri, et al., 2011), IFITM3 (Proteína transmembranal 3 inducida por interferón) (Yao, et al., 2011) (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013) y Viperin (proteína inhibidora de virus asociada al retículo endoplásmico inducida por interferón) (Karla, et al., 2011) (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013). Por otro lado la RNase L (Ribonuclease L) interfiere en la degradación del VHC (Han, Wroblewski, Xu, Silverman, & Barton, 2004) (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013).

De las siete proteínas ISG que presentan una actividad antiviral significativa, seis de ellas interfieren en la transcripción y traducción del VHC y la séptima interfiere degradándolo. Estas interacciones se muestran en la Figura 7 y están representadas por el lazo de retroalimentación con el número 1. Las proteínas y demás factores virales interfieren en la vía de señalización JAK STAT, los cuales disminuyen la expresión de genes estimulados por el interferón provocando de igual manera una disminución en la concentración del ARNm, lazo de retroalimentación 2 de la Figura 7.

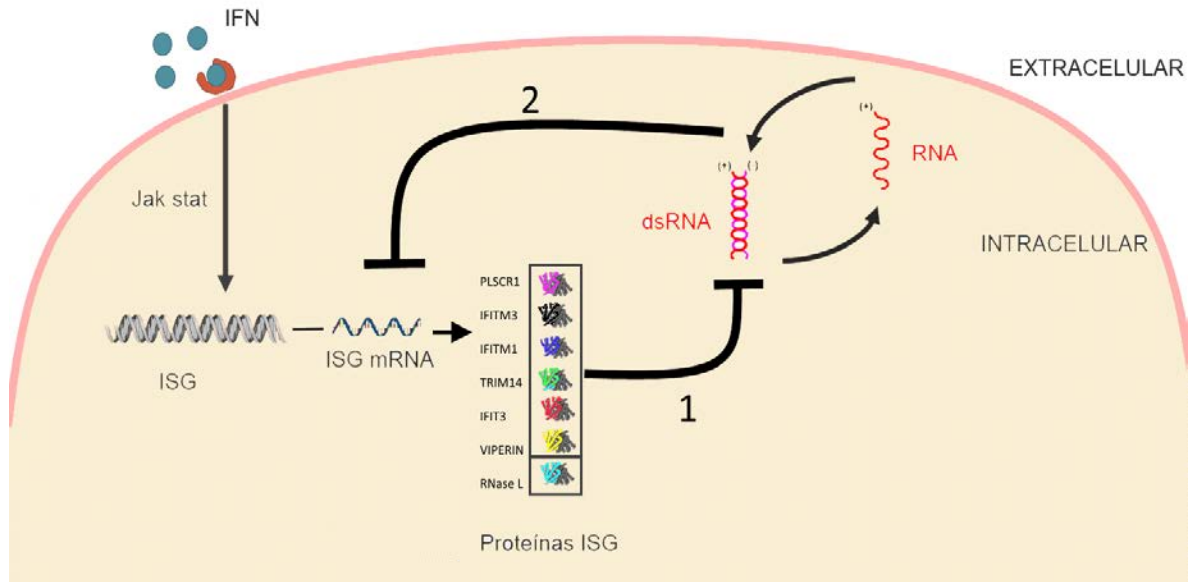


Figura 7 Red de señalización del hepatocito infectado con el VHC.

Respuesta del sistema inmune ante la infección del hepatocito con VHC, activación la red de señalización JAK-Stat mediada por el IFN dando como resultado la expresión de proteínas ISG que inhiben el VHC (1). El VHC inhibe la transcripción de los ISG inhibiendo la transcripción de los ISG (2). Las seis proteínas ISG en el primer cuadro disminuyen la replicación del virus, mientras la proteína del segundo cuadro actúa aumentando la degradación del VHC.

Hipótesis y objetivos

1.7 HIPÓTESIS

Es posible mediante experimentos in silico lograr la limpieza de las células infectadas por el virus de la hepatitis C con respuesta del sistema inmune y la sobreexpresión de una de las proteínas ISG.

1.8 OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar mediante modelación matemática los hepatocitos infectados por el virus de la hepatitis C, con respuesta del sistema inmune y determinar la proteína producida por el gen estimulado por el interferón que representa un mejor blanco terapéutico.

1.9 OBJETIVOS PARTICULARES

- Validar el modelo determinista de la red de señalización del hepatocito infectado con el VHC.
- Determinar el efecto individual de las proteínas ISG en la respuesta global de la red de señalización del hepatocito infectado con el VHC.
- Desarrollar y validar un modelo estocástico de la red de señalización del hepatocito infectado con el VHC.
- Estudiar la respuesta de la red de señalización del hepatocito infectado con el VHC ante variaciones en las proteínas ISG.

Método

1.10 DESARROLLO DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS

Para el desarrollo del modelo matemático se tomó de referencia un modelo matemático previamente reportado (Padmanabhan, Garaigorta, & Dixit, 2014) y para este estudio se ha simplificado el modelo matemático conservando las interacciones más relevantes de la representación biológica para este proyecto, las cuales se muestran en la Figura 7.

1.10.1 Modelo determinista

La red de señalización del interferón en presencia del VHC se realizó en diferentes etapas, la primera etapa comprende la replicación del virus descrita a continuación.

Cuando la célula está infectada por el VHC, la hebra positiva de ARN del VHC (R_P) sirve de molde para producir hebras negativas de ARN del VHC (R_M), la cual a su vez producirá nuevas hebras positivas de ARN del VHC y este ciclo se repite.

Las ecuaciones diferenciales que describen la evolución temporal de la concentración intracelular de la hebra positiva y la hebra negativa de ARN del VHC son:

$$\frac{d[R_P]}{dt} = V_+ \left(1 - \frac{[R_P] + [R_M]}{K_C} \right) (1 - \varepsilon_{IFN}^r) [R_M] - \frac{k_+}{1 - \varepsilon_{IFN}^d} [R_P] \quad (1)$$

$$\frac{d[R_M]}{dt} = V_- \left(1 - \frac{[R_P] + [R_M]}{K_C} \right) (1 - \varepsilon_{IFN}^r) [R_P] - k_- [R_M] \quad (2)$$

V_+ Es la tasa de producción de R_p a partir de R_M y V_- es la tasa de producción de R_M a partir de R_p , K_c es la capacidad máxima de la célula para producir viriones del VHC y es un término de restricción para la tasa máxima de replicación del VHC. k_+ Y k_- son las tasas de degradación de R_p y R_M respectivamente.

Se asume que el estímulo del IFN resulta en la expresión directa de las proteínas ISG, las cuales pueden interactuar con el virus de dos maneras, Las proteínas ISG pueden disminuir la replicación del VHC con una eficacia ε_{IFN}^r o mejorar la tasa de degradación de la hebra positiva del ARN del VHC con una eficacia ε_{IFN}^d (Dahari, Sainz, Perelson, & Uprichard, 2009).

De las más de cien proteínas ISG (Veer, et al., 2001; 69) estimuladas por el Interferón tipo I se ha demostrado que 7 de ellas presentan una significativa actividad anti VHC, (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013) debido a esto limitamos el modelo matemático a las 7 proteínas involucradas directamente en la actividad anti VHC las cuales son: IFIT3 (Proteína inducida por interferón con repetidos de tetra-tricopéptido 3), TRIM14 (proteína que contiene motivos tripartita 14), PLSCR1 (proteína mezcladora de fosfolípidos 1), IFITM1 (proteína transmembranal 1 inducida por interferón), IFITM3 (Proteína transmembranal 3 inducida por interferón) y Viperin (proteína inhibidora de virus asociada al retículo endoplásmico inducida por interferón). y RNase L (Ribonuclease L). Solo RNase L actúa degradando el ARN del VHC mientras las otras 6 interfieren en el ciclo de traducción y replicación.

Acorde a esto, la eficacia de supresión del virus está dada por las siguientes expresiones.

$$\varepsilon_{IFN}^d = 1 - \frac{K_d^{RNaseL}}{K_d^{RNaseL} + [P_{RNaseL}]} \quad (3)$$

$$\varepsilon_{IFN}^r = 1 - \left(\frac{K_R^{IFIT3}}{K_R^{IFIT3} + [P_{IFIT3}]} \right) \left(\frac{K_R^{IFITM1}}{K_R^{IFITM1} + [P_{IFITM1}]} \right) \left(\frac{K_R^{IFITM3}}{K_R^{IFITM3} + [P_{IFITM3}]} \right) \quad (4)$$

$$* \left(\frac{K_R^{PLSCR1}}{K_R^{PLSCR1} + [P_{PLSCR1}]} \right) \left(\frac{K_R^{TRIM14}}{K_R^{TRIM14} + [P_{TRIM14}]} \right) \left(\frac{K_R^{VIPERIN}}{K_R^{VIPERIN} + [P_{VIPERIN}]} \right)$$

K_R^{IFIT3} Es el coeficiente de represión asociado a la proteína IFIT3 y así sucesivamente para todos los términos de las proteínas que intervienen en la represión del VHC, K_d^{RNaseL} es el coeficiente de represión para la degradación de Rp por RNase L. Se considera la participación de cada una de las proteínas independiente de las otras y por simplicidad se considera que la hebra negativa siempre está como hebra doble $R_M = R_{ds}$ (Dahari, Ribeiro, Rice, & Perelson, 2007).

La segunda etapa del modelo consiste en la transcripción del ADN con los ISG.

Para la producción del ARNm de las siete proteínas se considera una tasa de transcripción basal, V_0^{ISG} . El interferón se considera en el modelo como la suma del interferón endógeno y exógeno.

Usando cinética de Michaelis-Menten se definen para cada una de las reacciones: una velocidad máxima de reacción V_m^{ISG} y la constante de Michaelis-Menten dependiente de la concentración del IFN, K_{IFM}^{ISG} .

La degradación del ARNm de los ISG está dados por una tasa de degradación constante K_m^{IFIT3} .

Se asume que las proteínas u otros factores virales que interfieren con JAK–Stat son proporcionales a la concentración de las hebra positiva R_p dando como resultado una inhibición en la producción del ARNm ISG.

$$\frac{d[M_{IFIT3}]}{dt} = V_0^{IFIT3} + V_m^{IFIT3} \frac{[IFN]}{K_{IFN}^{IFIT3} + [IFN]} \frac{K_H}{K_H + [R_p]} - K_m^{IFIT3} [M_{IFIT3}] \quad (5)$$

$$\frac{d[M_{IFITM1}]}{dt} = V_0^{IFITM1} + V_m^{IFITM1} \frac{[IFN]}{K_{IFN}^{IFITM1} + [IFN]} \frac{K_H}{K_H + [R_P]} - K_m^{IFITM1} [M_{IFITM1}] \quad (6)$$

$$\frac{d[M_{IFITM3}]}{dt} = V_0^{IFITM3} + V_m^{IFITM3} \frac{[IFN]}{K_{IFN}^{IFITM3} + [IFN]} \frac{K_H}{K_H + [R_P]} - K_m^{IFITM3} [M_{IFITM3}] \quad (7)$$

$$\frac{d[M_{TRIM14}]}{dt} = V_0^{TRIM14} + V_m^{TRIM14} \frac{[IFN]}{K_{IFN}^{TRIM14} + [IFN]} \frac{K_H}{K_H + [R_P]} - K_m^{TRIM14} [M_{TRIM14}] \quad (8)$$

$$\frac{d[M_{PLSCR1}]}{dt} = V_0^{PLSCR1} + V_m^{PLSCR1} \frac{[IFN]}{K_{IFN}^{PLSCR1} + [IFN]} \frac{K_H}{K_H + [R_P]} - K_m^{RNaseL} [M_{PLSCR1}] \quad (9)$$

$$\frac{d[M_{RNaseL}]}{dt} = V_0^{RNaseL} + V_m^{RNaseL} \frac{[IFN]}{K_{IFN}^{RNaseL} + [IFN]} \frac{K_H}{K_H + [R_P]} - K_m^{RNaseL} [M_{RNaseL}] \quad (10)$$

$$\frac{d[M_{Viperin}]}{dt} = V_0^{Viperin} + V_m^{Viperin} \frac{[IFN]}{K_{IFN}^{Viperin} + [IFN]} \frac{K_H}{K_H + [R_P]} - K_m^{Viperin} [M_{Viperin}] \quad (11)$$

La tercera etapa del modelo consiste en la traducción de las proteínas ISG

Una vez se tienen las ecuaciones para los correspondientes mRNA se plantean las ecuaciones para la concentración de cada una de las proteínas ISG.

Primero se define la tasa de producción la cual está únicamente ligada a la traducción del mRNA, K_t^{ISG} y la tasa de degradación se define con una tasa constante k_i^{ISG} .

Las ecuaciones diferenciales que describen la dinámica temporal de las 7 proteínas ISG quedan de la siguiente manera.

$$\frac{d[P_{IFIT3}]}{dt} = k_t^{IFIT3} [M_{IFIT3}] - k_i^{IFIT3} [P_{IFIT3}] \quad (12)$$

$$\frac{d[P_{IFITM1}]}{dt} = k_t^{IFITM1}[M_{IFITM1}] - k_i^{IFITM1}[P_{IFITM1}] \quad (13)$$

$$\frac{d[P_{IFITM3}]}{dt} = k_t^{IFITM3}[M_{IFITM3}] - k_i^{IFITM3}[P_{IFITM3}] \quad (14)$$

$$\frac{d[P_{TRIM14}]}{dt} = k_t^{TRIM14}[M_{TRIM14}] - k_i^{TRIM14}[P_{TRIM14}] \quad (15)$$

$$\frac{d[P_{TRIM14}]}{dt} = k_t^{TRIM14}[M_{TRIM14}] - k_i^{TRIM14}[P_{TRIM14}] \quad (16)$$

$$\frac{d[P_{RNaseL}]}{dt} = k_t^{RNaseL}[M_{RNaseL}] - k_i^{RNaseL}[P_{RNaseL}] \quad (17)$$

$$\frac{d[P_{Viperin}]}{dt} = k_t^{Viperin}[M_{Viperin}] - k_i^{Viperin}[P_{Viperin}] \quad (18)$$

Con todas las ecuaciones diferenciales acopladas que representan la concentración de cada una de las especies químicas dentro del modelo se procede a la búsqueda de los parámetros y en el caso de no estar previamente reportados se utilizan algoritmos de variación de parámetros para encontrar el valor y/o la combinación de los mismos que den un mejor ajuste, todos los parámetros se convirtieron a las mismas unidades necesarias y se define un valor fijo de $2425 \mu m^3$ como el volumen de los hepatocitos.

Parámetro	Descripción	Unidades	Valor	Referencia
V_+	Tasa constante de producción de R_p a partir de R_M	h^{-1}	9.46×10^{-1}	(Padmanabhan, Garaigorta, & Dixit, 2014)
V_-	Tasa constante de producción de R_M a partir de R_p	h^{-1}	4.73×10^{-2}	(Padmanabhan, Garaigorta, & Dixit, 2014)
K_C	Cantidad máxima de copias de ARN de VHC por célula	$moléculas\ célula^{-1}$	317.54	(Padmanabhan, Garaigorta, & Dixit, 2014)
k_+	Tasa constante de degradación de la hebra positiva de ARN del VHC	h^{-1}	4.62×10^{-2}	(Ribeiro, et al., 2012)
k_-	Tasa constante de degradación de la hebra negativa de ARN del VHC	h^{-1}	5.77×10^{-2}	(Ribeiro, et al., 2012)
k_m^{IFIT3}	Tasa constante de degradación del ARNm de IFIT3	h^{-1}	9.27×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
k_m^{IFITM1}	Tasa constante de degradación del ARNm de IFITM1	h^{-1}	6.21×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
k_m^{IFITM3}	Tasa constante de degradación del ARNm de IFITM3	h^{-1}	7.47×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
k_m^{TRIM14}	Tasa constante de degradación del ARNm de TRIM14	h^{-1}	1.59×10^{-1}	(HAROVA, et al., 2009)
$k_m^{RNase L}$	Tasa constante de degradación del ARNm de RNase L	h^{-1}	6.75×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
$k_m^{Viperin}$	Tasa constante de degradación del ARNm de Viperin	h^{-1}	3.15×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
k_m^{PLSCR1}	Tasa constante de degradación del ARNm de PLSCR1	h^{-1}	1.06×10^{-1}	(HAROVA, et al., 2009)
k_i^{IFIT3}	Tasa constante de degradación de la proteína IFIT3	h^{-1}	2.9×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
k_i^{IFITM1}	Tasa constante de degradación de la proteína IFITM1	h^{-1}	6.19×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
k_i^{IFITM3}	Tasa constante de degradación de la proteína IFITM3	h^{-1}	6.19×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)

k_i^{TRIM14}	Tasa constante de degradación de la proteína TRIM14	h^{-1}	3.75×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
$k_i^{RNase L}$	Tasa constante de degradación de la proteína RNase L	h^{-1}	2.39×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
$k_i^{Viperin}$	Tasa constante de degradación de la proteína Viperin	h^{-1}	6.08×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
k_i^{PLSCR1}	Tasa constante de degradación de la proteína PLSCR1	h^{-1}	6.08×10^{-2}	(HAROVA, et al., 2009)
V_m^{IFIT3}	Tasa de transcripción IFIT3	$moléculas\ célula^{-1}\ h^{-1}$	124.19	(NCBI, 2015) NM_001031683.2
V_m^{IFITM1}	Tasa de transcripción IFITM1	$moléculas\ célula^{-1}\ h^{-1}$	417.46	(NCBI, 2015) NM_003641.3
V_m^{IFITM3}	Tasa de transcripción IFITM3	$moléculas\ célula^{-1}\ h^{-1}$	451.33	(NCBI, 2015) NM_021034.2
V_m^{TRIM14}	Tasa de transcripción TRIM14	$moléculas\ célula^{-1}\ h^{-1}$	171.05	(NCBI, 2015) NM_033220.1
$V_m^{RNase L}$	Tasa de transcripción RNase L	$moléculas\ célula^{-1}\ h^{-1}$	71.86	(NCBI, 2015) NM_021133.3
$V_m^{Viperin}$	Tasa de transcripción Viperin	$moléculas\ célula^{-1}\ h^{-1}$	107.26	(NCBI, 2015) AF442151.1
V_m^{PLSCR1}	Tasa de transcripción PLSCR1	$moléculas\ célula^{-1}\ h^{-1}$	137.34	(NCBI, 2015) NM_021105.2
K_t^{IFIT3}	Tasa de traducción IFIT3	$célula\ moléculas^{-1}\ h^{-1}$	80.85	(NCBI, 2015) NP_001540.2
K_t^{IFITM1}	Tasa de traducción IFITM1	<i>adimensional</i>	316.25	(NCBI, 2015) NP_003632.3
K_t^{IFITM3}	Tasa de traducción IFITM3	<i>adimensional</i>	297	(NCBI, 2015) AFF60355.1
K_t^{TRIM14}	Tasa de traducción TRIM14	<i>adimensional</i>	89.65	(NCBI, 2015) NP_150088.1
$K_t^{RNase L}$	Tasa de traducción RNase L	<i>adimensional</i>	60.77	(NCBI, 2015) AAH90934.1

$K_t^{Viperin}$	Tasa de traducción Viperin	<i>adimensional</i>	109.72	(NCBI, 2015) AAL50053.1
K_t^{PLSCR1}	Tasa de traducción PLSCR1	<i>adimensional</i>	124.57	(NCBI, 2015) NP_066928.1
K_{IFN}^{IFIT3}	Dosis de IFN para que la producción de ARNm de la ISG sea la mitad del máximo	$IU\ ml^{-1}$	7.12	(Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
K_{IFN}^{IFITM1}	Dosis de IFN para que la producción de ARNm de la ISG sea la mitad del máximo	$IU\ ml^{-1}$	45.09	(Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
K_{IFN}^{IFITM3}	Dosis de IFN para que la producción de ARNm de la ISG sea la mitad del máximo	$IU\ ml^{-1}$	109.77	(Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
K_{IFN}^{TRIM14}	Dosis de IFN para que la producción de ARNm de la ISG sea la mitad del máximo	$IU\ ml^{-1}$	20.66	(Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
$K_{IFN}^{RNase\ L}$	Dosis de IFN para que la producción de ARNm de la ISG sea la mitad del máximo	$IU\ ml^{-1}$	20.65	(Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
$K_{IFN}^{Viperin}$	Dosis de IFN para que la producción de ARNm de la ISG sea la mitad del máximo	$IU\ ml^{-1}$	139.86	(Karla, et al., 2011)
K_{IFN}^{PLSCR1}	Dosis de IFN para que el ARNm del ISG sea la mitad del máximo	$IU\ ml^{-1}$	14.31	(Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
V_0^{IFIT3}	Tasa constante de producción intrínseca del ARNm del IFIT3	$moléculas\ h^{-1}$	6.67	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
V_0^{IFITM1}	Tasa constante de producción intrínseca del ARNm del IFITM1	$moléculas\ h^{-1}$	1.58	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
V_0^{IFITM3}	Tasa constante de producción intrínseca del ARNm del IFITM3	$moléculas\ h^{-1}$	7.44	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
V_0^{TRIM14}	Tasa constante de producción intrínseca del ARNm del TRIM14	$moléculas\ h^{-1}$	54.82	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
$V_0^{RNase\ L}$	Tasa constante de producción intrínseca del ARNm del RNase L	$moléculas\ h^{-1}$	56.14	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
$V_0^{Viperin}$	Tasa constante de producción intrínseca del ARNm del Viperin	$moléculas\ h^{-1}$	0.05	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)

V_0^{PLSCR1}	Tasa constante de producción intrínseca del ARNm del PLSCR1	<i>moléculas h⁻¹</i>	16.71	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
K_r^{IFIT3}	Tasa constante de represión de la replicación del VHC	<i>moléculas célula⁻¹</i>	1.9×10^5	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
K_r^{IFITM1}	Tasa constante de represión de la replicación del VHC	<i>moléculas célula⁻¹</i>	1.9×10^5	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
K_r^{IFITM3}	Tasa constante de represión de la replicación del VHC	<i>moléculas célula⁻¹</i>	1.12×10^6	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
K_r^{TRIM14}	Tasa constante de represión de la replicación del VHC	<i>moléculas célula⁻¹</i>	2.64×10^6	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
$K_d^{RNase L}$	Tasa constante de represión de la degradación del VHC	<i>moléculas célula⁻¹</i>	4.67×10^7	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
$K_r^{Viperin}$	Tasa constante de represión de la replicación del VHC	<i>moléculas célula⁻¹</i>	1.33×10^6	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)
K_r^{PLSCR1}	Tasa constante de represión de la replicación del VHC	<i>moléculas célula⁻¹</i>	1.16×10^6	Calculado de (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013)

Tabla 1. Parámetros del modelo determinista.

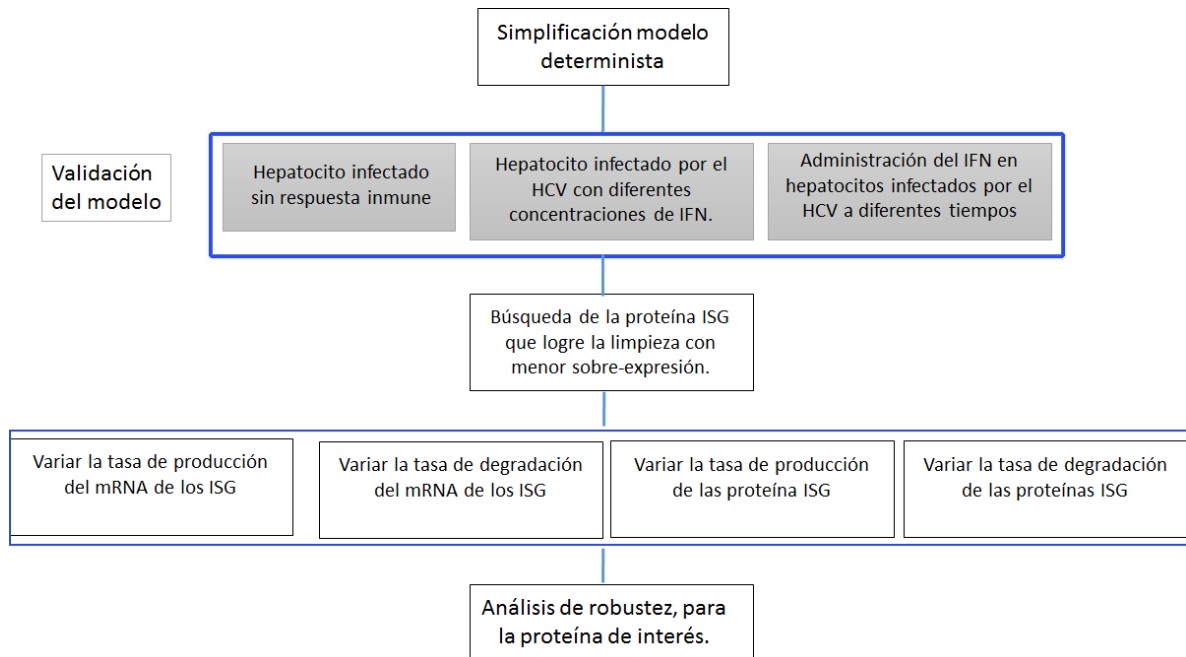


Figura 8 Diagrama de bloques para el análisis determinista

1.10.2 Modelo estocástico

El modelo estocástico se genera a partir de las ecuaciones diferenciales y se convierte a un sistema de reacciones el cual se describe en la siguiente tabla. Los términos de producción y degradación se convierten en las respectivas propensiones y luego el sistema se resuelve usando el método directo del algoritmo de simulaciones estocásticas (SSA) (Gillespie, 1977).

Reacción	Descripción	Propensión
$R_M \rightarrow R_P$	Producción de R_P a partir de R_M	$K_{RP-RM} [R_M]$
$R_P \rightarrow \phi$	Degradación de R_P	$K_{RP} [R_P]$
$R_P \rightarrow R_M$	Producción de R_M a partir de R_P	$K_{RM-RP} [R_P]$
$R_M \rightarrow \phi$	Degradación de R_M	$K_{RM} [R_M]$
$\phi \rightarrow M_1$	Producción del ARNm <i>IFIT3</i>	$V_m^1 \frac{0.5}{0.5 + [R_P]}$
$\phi \rightarrow M_2$	Producción del ARNm <i>IFITM1</i>	$V_m^2 \frac{0.5}{0.5 + [R_P]}$
$\phi \rightarrow M_3$	Producción del ARNm <i>IFITM3</i>	$V_m^3 \frac{0.5}{0.5 + [R_P]}$
$\phi \rightarrow M_4$	Producción del ARNm <i>TRIM14</i>	$V_m^4 \frac{0.5}{0.5 + [R_P]}$
$\phi \rightarrow M_5$	Producción del ARNm <i>PLSCR1</i>	$V_m^5 \frac{0.5}{0.5 + [R_P]}$
$\phi \rightarrow M_6$	Producción del ARNm <i>RNase L</i>	$V_m^6 \frac{0.5}{0.5 + [R_P]}$
$\phi \rightarrow M_7$	Producción del ARNm <i>Viperin</i>	$V_m^7 \frac{0.5}{0.5 + [R_P]}$

$M_1 \rightarrow \phi$	Degradación del ARNmIFIT3	$K_{M1} [M_1]$
$M_2 \rightarrow \phi$	Degradación del ARNmIFITM1	$K_{M2} [M_2]$
$M_3 \rightarrow \phi$	Degradación del ARNmIFITM3	$K_{M3} [M_3]$
$M_4 \rightarrow \phi$	Degradación del ARNmTRIM14	$K_{M4} [M_4]$
$M_5 \rightarrow \phi$	Degradación del mRNA PLSCR1	$K_{M5} [M_5]$
$M_6 \rightarrow \phi$	Degradación del ARNm RNase L	$K_{M6} [M_6]$
$M_7 \rightarrow \phi$	Degradación del ARNm Viperin	$K_{M7} [M_7]$
$M_1 \rightarrow P_1$	Producción de la proteína IFIT3 a partir de M_1	$K_{PM1} [M_1]$
$M_2 \rightarrow P_2$	Producción de la proteína IFITM1 a partir de M_2	$K_{PM2} [M_2]$
$M_3 \rightarrow P_3$	Producción de la proteína IFITM3 a partir de M_3	$K_{PM3} [M_3]$
$M_4 \rightarrow P_4$	Producción de la proteína TRIM14 a partir de M_4	$K_{PM4} [M_4]$
$M_5 \rightarrow P_5$	Producción de la proteína PLSCR1 a partir de M_5	$K_{PM5} [M_5]$
$M_6 \rightarrow P_6$	Producción de la proteína RNase L a partir de M_6	$K_{PM6} [M_6]$
$M_7 \rightarrow P_7$	Producción de la proteína Viperin a partir de M_7	$K_{PM7} [M_7]$
$P_1 \rightarrow \phi$	Degradación de la proteína IFIT3	$K_{P1} [P_1]$
$P_2 \rightarrow \phi$	Degradación de la proteína IFITM1	$K_{P2} [P_2]$

$P_3 \rightarrow \phi$	Degradación de la proteína IFITM3	$K_{P_3} [P_3]$
$P_4 \rightarrow \phi$	Degradación de la proteína TRIM14	$K_{P_4} [P_4]$
$P_5 \rightarrow \phi$	Degradación de la proteína PLSCR1	$K_{P_5} [P_5]$
$P_6 \rightarrow \phi$	Degradación de la proteína RNase L	$K_{P_6} [P_6]$
$P_7 \rightarrow \phi$	Degradación de la proteína Viperin	$K_{P_7} [P_7]$

Tabla 2. Sistema de reacciones y propensiones.

Una vez se tienen las ecuaciones diferenciales que describen la dinámica de cada una de las especies químicas involucradas dentro de la red de señalización se procede a darle los valores de cada uno de los parámetros y posteriormente se resuelve el sistema, para el conjunto de ecuaciones diferenciales se usó el método de solución numérica ODE15s en MATLAB.

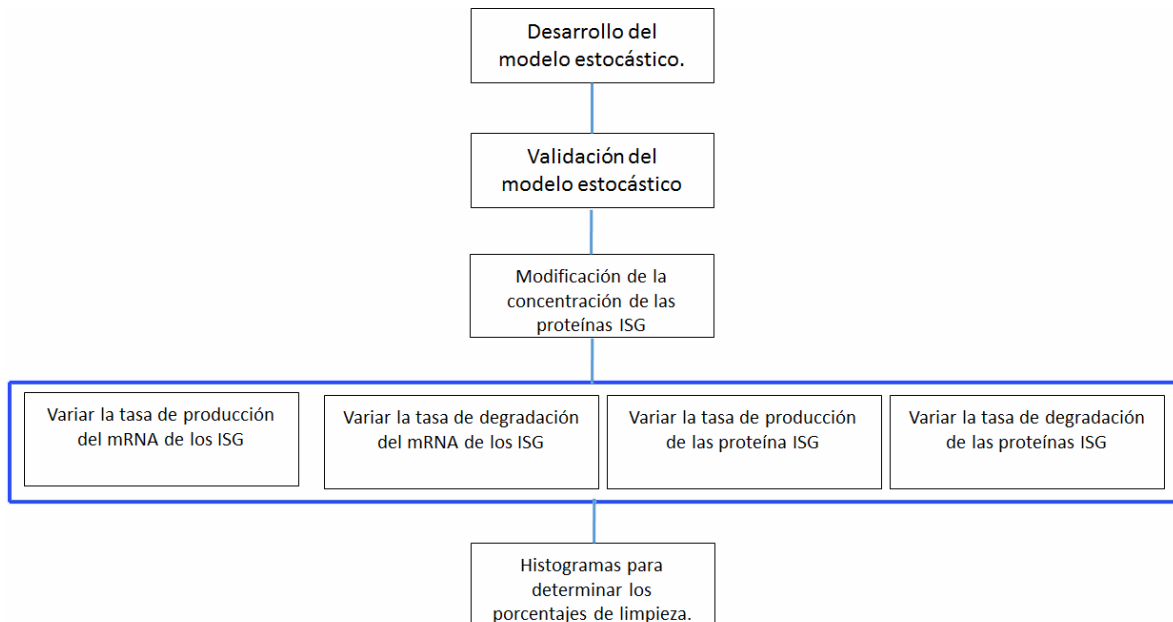


Figura 9 Diagrama de bloques para el análisis estocástico

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se presentan en dos secciones, la primera sección comprende el análisis determinista y la segunda sección el análisis estocástico.

1.11 MODELO DETERMINISTA

El modelo determinista comprende las ecuaciones diferenciales (1)-(18) y el conjunto de parámetros de la Tabla 1.

Para la validación del modelo determinista se realizó una serie de simulaciones con base en sus contrapartes experimentales para poder hacer una comparación.

1.11.1 Infección del hepatocito sin respuesta del sistema inmune

Para observar la evolución temporal de la carga viral en hepatocitos infectados por el VHC se realizó una simulación usando las ecuaciones diferenciales (1) y (2), para simular una respuesta del sistema inmune nula se fijaron los términos $\varepsilon_{IFN}^r = 0$ y $\varepsilon_{IFN}^d = 0$.

La Figura 10 muestra en color azul la predicción del modelo de la evolución temporal de la carga viral en hepatocitos infectados por el HCV, en contraste los círculos en color verde representan los datos obtenidos experimentalmente (Garaigorta & Chisari, 2010). En los experimentos se infectó hepatocitos humanos inmortalizados con el VHC genotipo JFH-1 (Kato, et al., 2001) y se midió la carga viral a diferentes tiempos pos-infección. La simulación se ajusta con los puntos experimentales con un $R^2 = 0.97$ lo que nos permite afirmar que el modelo está reproduciendo fehacientemente el comportamiento observado experimentalmente.

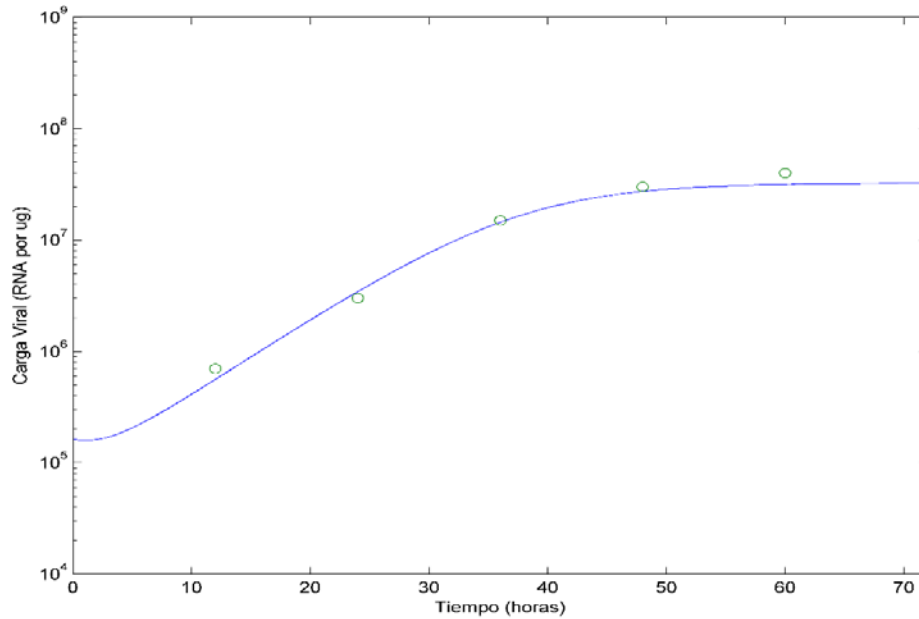


Figura 10 Dinámica del virus sin Interferón en hepatocitos

Los círculos de color verde representan los datos experimentales obtenidos a diferentes horas pos infección y la línea en color azul corresponde a la predicción del modelo. Se usó un factor de escala proporcional al número de hepatocitos por μg igual a $1.62 \times 10^5 \text{ células } \mu g \text{ RNA}^{-1}$

1.11.2 Variación temporal en la respuesta del sistema inmune en hepatocitos con VHC

Para determinar si el tiempo pos-infección de la respuesta del sistema inmune es un factor determinante en la carga viral en los hepatocitos, se llevó a cabo una simulación usando las ecuaciones (1)-(18) a diferentes horas pos-infección: 12, 24, 36, 48, 60, 72; considerando una concentración del IFN=100UI como la respuesta del sistema inmune. Ver (Figura 11 Figura 12)

Para efectos de validación se utilizó el experimento desarrollado por Garaigorta (Garaigorta & Chisari, 2010) en donde se muestra la dependencia del tiempo al cual se le administra el interferón a los cultivos celulares infectados por el VHC. Los experimentos se llevaron a cabo en la línea celular huh-7 con una multiplicidad de infección de 3, se les administro una dosis de 100UI de interferón a diferentes horas pos infección, a las 20 horas posteriores a la administración del interferón se procesaron por inmunofluorescencia para la detección de

dsRNA, E2 y el núcleo. Se observó que a partir de las 36 horas pos infección no hay una eliminación o disminución del ARN del VHC y para los tiempos menores a 24 horas no hay presencia del virus. Ver Figura 12

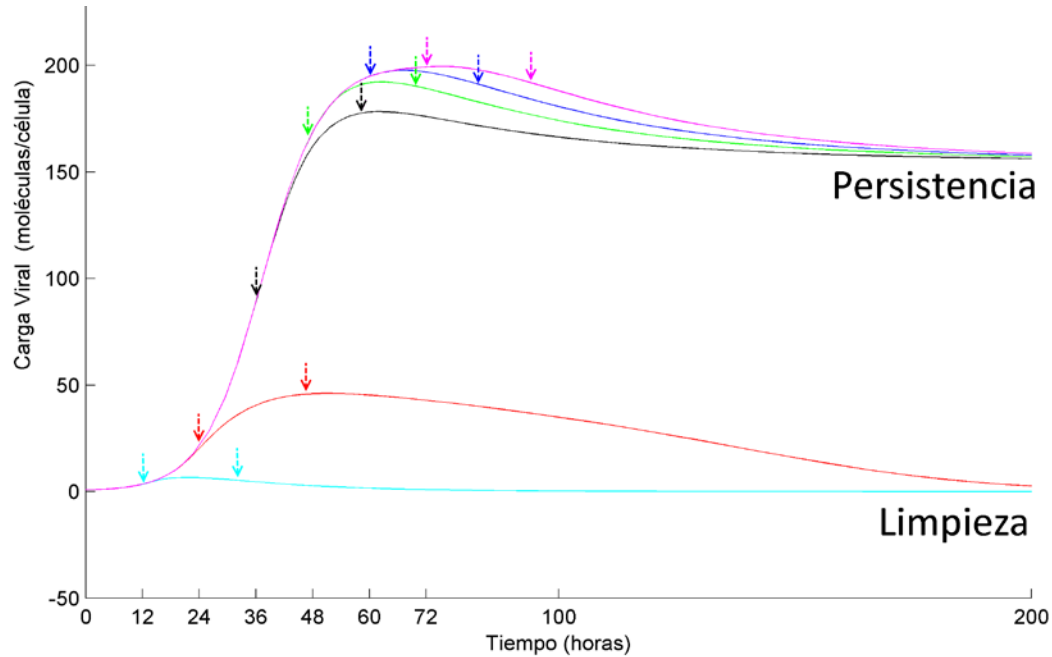


Figura 11 Interferón a diferentes tiempos pos infección

Diferentes tiempos pos infección del tratamiento con interferón (100UI). Cada línea de color representa una célula infectada por el VHC. Se administró interferón a diferentes tiempos y se cuantifico a las 20 horas posteriores a la administración. Las flechas del mismo color sobre cada línea denotan el instante de administración (12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas pos-infección) y de medición

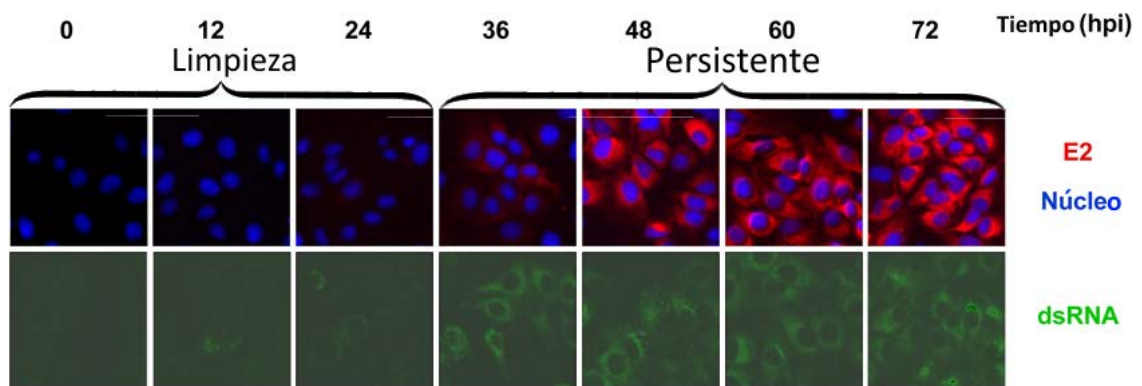


Figura 12 Cultivos tratados a diferentes tiempos pos infección.

Cultivos infectados en paralelo fueron infectados por el VHC y se les administro interferón a los tiempos establecidos (hpi) por un tiempo de 20 horas. Los cultivos celulares fueron procesados por fluorescencia para la detección de dsRNA del VHC (verde), E2 en rojo y el núcleo en azul. (Garaigorta & Chisari, 2010).

1.11.3 Diferentes dosis de interferón en hepatocitos infectados por el VHC

Los tratamientos a base de interferón pegilado aumentan la concentración del interferón de manera exógena, pero este aumento no siempre es suficiente para lograr la limpieza y su posterior SVR. Para simular diferentes dosis de interferón se usaron las ecuaciones (1)-(18) modificándose la concentración del interferón. Se realizaron variaciones en la concentración del interferón (50 UI, 100 UI, 200 UI y 1000 UI) a dos tiempos pos-infección fijos (a las 16 horas y a las 30 horas pos-infección).

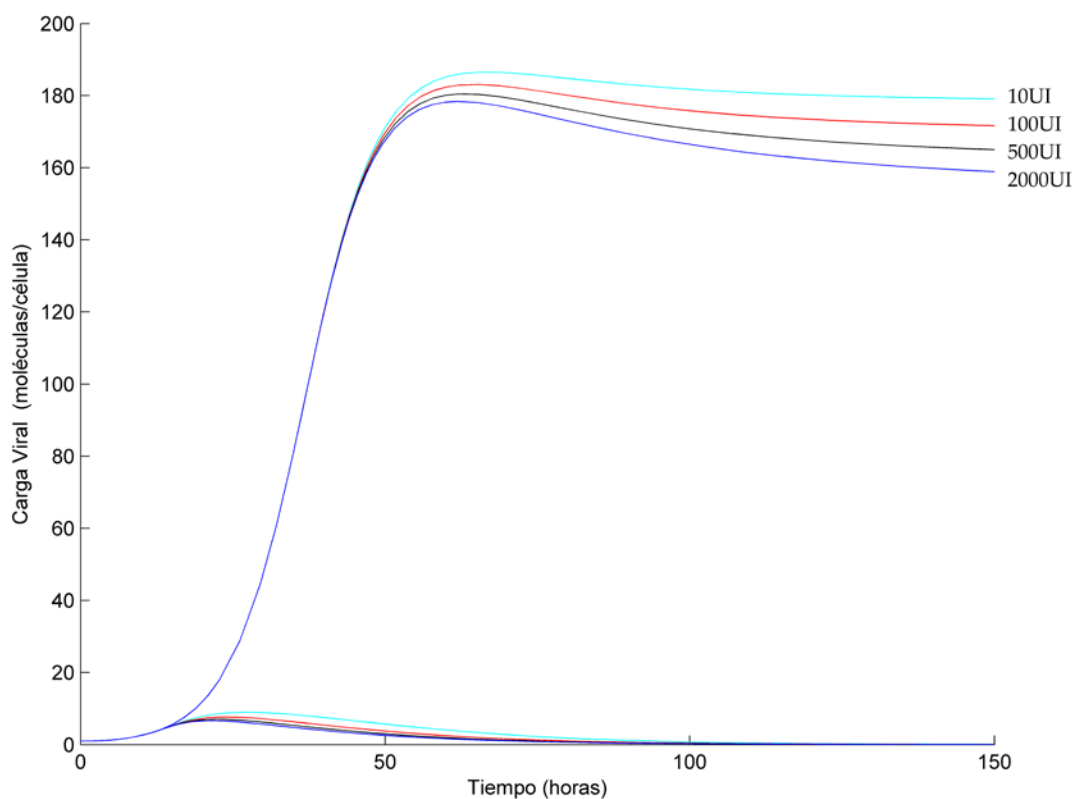


Figura 13 Diferentes dosis de interferón

El conjunto de gráficas que están con carga viral alta representan la administración del interferón a 30 horas pos infección y el conjunto con baja carga viral corresponde a 16 horas pos infección, cada par de líneas del mismo color representa una dosis diferente de interferón, cian 50 UI, rojo 100 UI, negro 200 UI y azul 1000 UI.

De las simulaciones se puede concluir que incluso ante dosis elevadas de interferón se conserva la biestabilidad en la vía de señalización y es coherente con los reportes de experimentos in vitro. (Garaigorta & Chisari, 2010) (Karla, et al., 2011) (Metz, Reuter, Bender, & Bartenschlager, 2013).

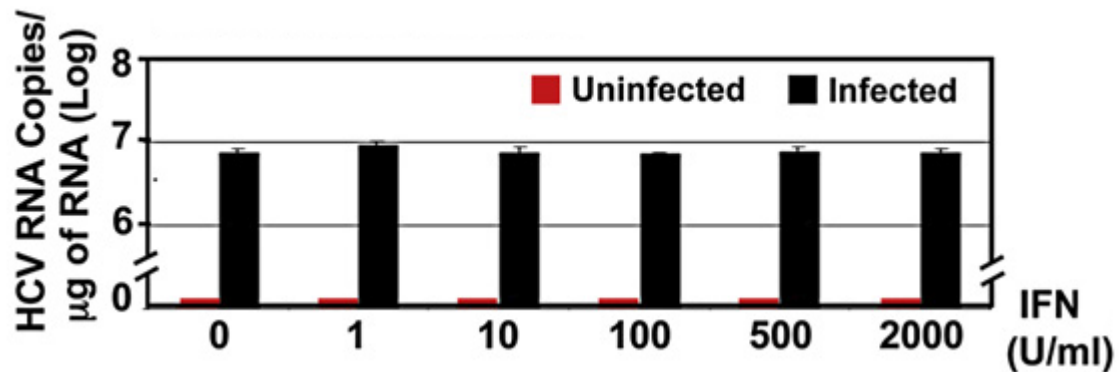


Figura 14 células tratadas con diferentes dosis de interferón.

Líneas celulares huh-7 fueron infectadas con el virus JFH-1 y 5 días pos-infección se trataron por 16 horas con diferentes dosis de IFN (0, 1, 10, 100, 500 y 2000) y no se presenta la limpieza de las células (Garaigorta & Chisari, 2010) en color rojo huh-7 tratadas con interferón sin estar infectadas por el VHC para ser usadas como control.

1.11.4 Biestabilidad

Un sistema biestable se caracteriza por dos estados estacionarios estables y uno inestable, el sistema tiende a cualquiera de los dos estados estables dependiendo de las condiciones iniciales. Para determinar la biestabilidad en el modelo se calcularon los puntos de equilibrio, haciendo uso del método empleado en (Ferrell & Xiong, 2001).

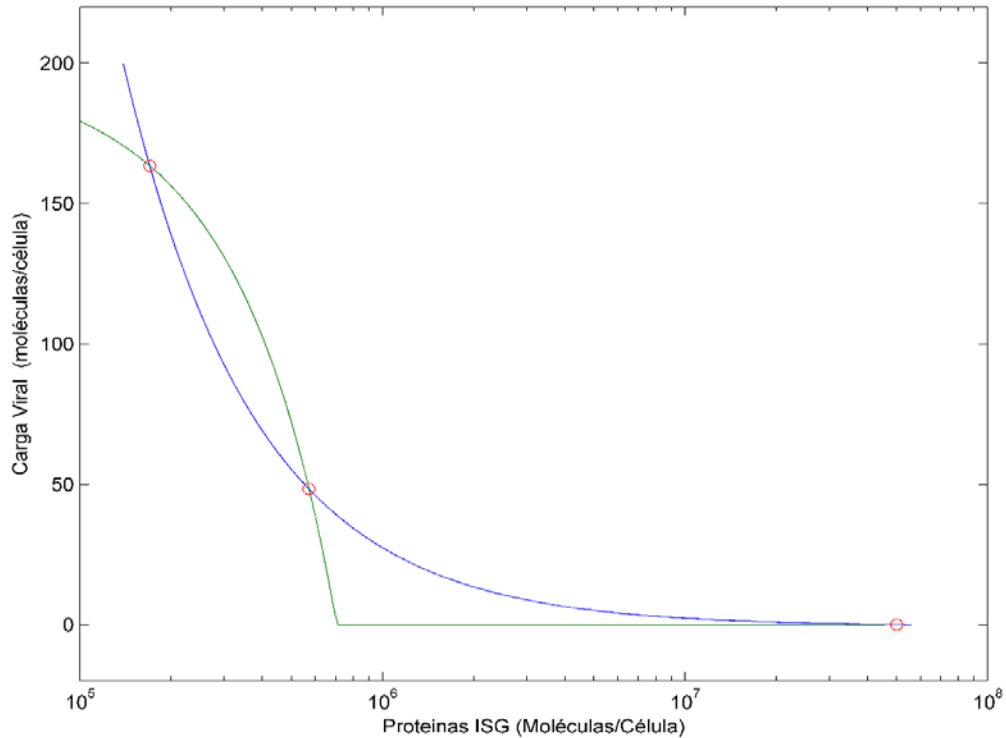


Figura 15 Puntos de equilibrio.

Concentración de la hebra positiva de ARN del VHC para diferentes valores del total de las proteínas ISG (azul) y concentración total de las proteínas ISG variando la concentración de la hebra positiva del ARN del VHC (verde), los círculos de color rojo representan los estados estacionarios del sistema.

En la Figura 15, la línea de color azul representa la dependencia de los estados estacionarios de las proteínas ISG en la concentración del VHC y la línea de color verde representa la dependencia de la concentración del VHC sobre las proteínas ISG.

La intersección de las curvas representan los 3 puntos de equilibrio de este sistema, un punto estable en 163 *moléculas/célula* que representa la carga viral en estado persistente, el otro estado estable está ubicado en 0 *moléculas/célula* siendo este el estado de limpieza o eliminación del virus y el tercer punto es inestable y está ubicado en 48 *moléculas célula*.

1.11.5 Estados estacionarios al variar la tasa de expresión del mRNA

El diagrama de bifurcación se construyó al modificar la tasa de producción del ARNm de la proteína ISG V_m^{FITM1} y se calculó el valor de cada uno de los puntos de equilibrio. Este

procedimiento se realizó para cada uno de los ARNm de las diferentes proteínas ISG de manera independiente y se realizó con una dosis de IFN=100UI.

A partir del diagrama de bifurcación se puede apreciar un switch con histéresis, y esto es coherente con las observaciones previas ya que no depende únicamente del estímulo que se le administre (IFN) Figura 13, sino también de su historia (Carga viral) Figura 11 .

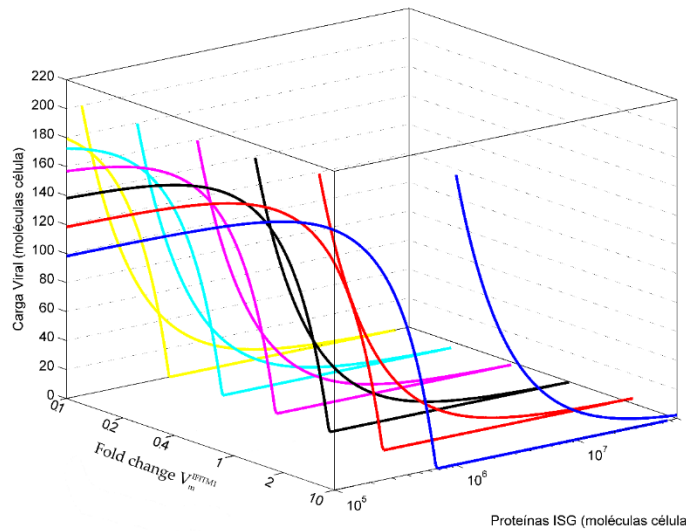


Figura 16 Puntos de equilibrio para diferentes valores de V_m^{FITM1} .

Los puntos de equilibrio se calcularon para diferentes valores de V_m^{FITM1} en una ventana establecida de un orden de magnitud arriba y uno abajo del valor nominal (desde 0.1 hasta 10 veces el valor nominal), en color azul se multiplico por 10 veces su valor nominal el cual representa un incremento del 900%, en color rojo un incremento del 100%, en color negro el valor nominal, en color magenta 40%, en color cian por 20% y por último en color amarillo por 10%. .

El diagrama de bifurcación se realizó para cada uno los ARNm de las proteínas ISG y se calculó el valor límite en el cual se pierde la biestabilidad, en los diagramas de bifurcación se aprecian dos regiones, la zona I representa la zona biestable, quiere decir, que el sistema puede estar en cualquiera de los dos estados dependiendo de sus condiciones iniciales (carga viral y tiempo de administración del interferón) y la zona II solo permite el estado de limpieza ante cualquier condición inicial. Se determinó que el parámetro más sensible o con

mayor impacto en la respuesta global del sistema ante variaciones más pequeñas es, V_m^{IFITM1} el cual requiere un incremento del 80% para lograr llevar al sistema a la zona II y asegurar la limpieza, en comparación con el siguiente parámetro con mayor sensibilidad V_m^{IFIT3} , el cual requiere un incremento superior al 300% (color rojo en la Figura 17) para alcanzar una respuesta similar.

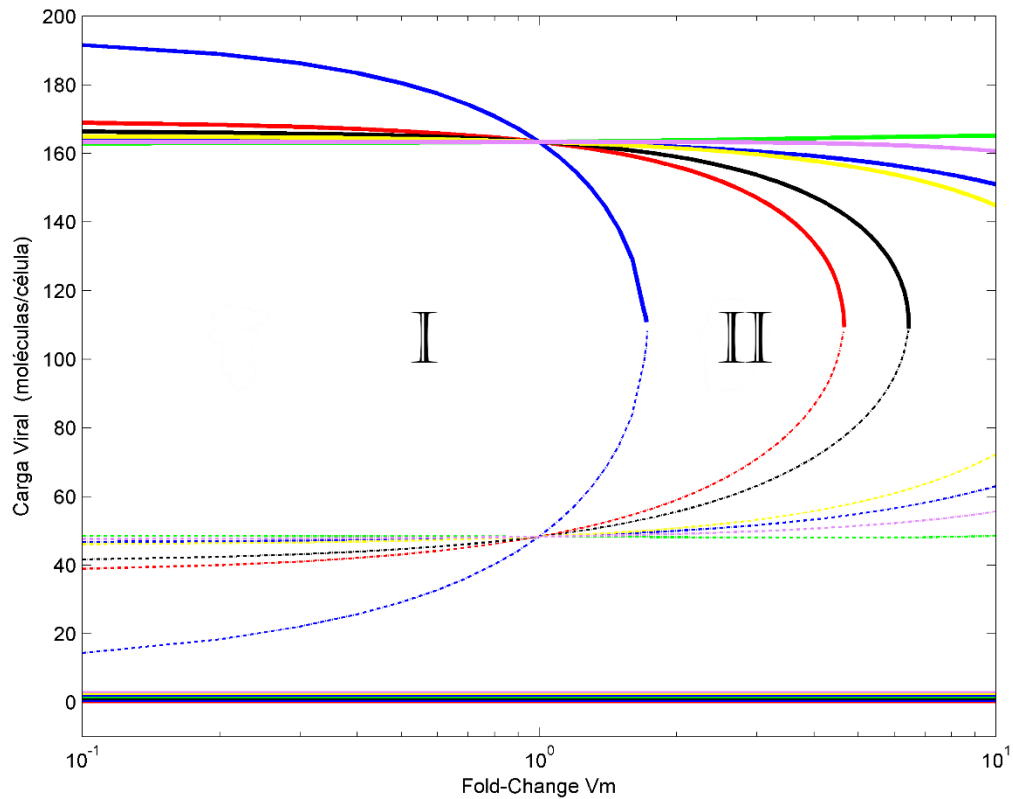


Figura 17 Diagrama de bifurcación de las ISG

Diagrama de bifurcación en donde se ve la región de biestabilidad con los 2 estados posibles del sistema, y para algunas de los ARNm se aprecia una región monoestable con un estado único que es la limpieza, por ejemplo, para el ARNm IFITM1 (azul) estas regiones están en (I) y (II) respectivamente. En color rojo para el ARNm IFIT3, en negro para el ARNm IFITM3, para los demás ARNm de las proteínas ISG se necesitan cambios muy grandes en este parámetro por lo cual no se aprecian en la ventana.

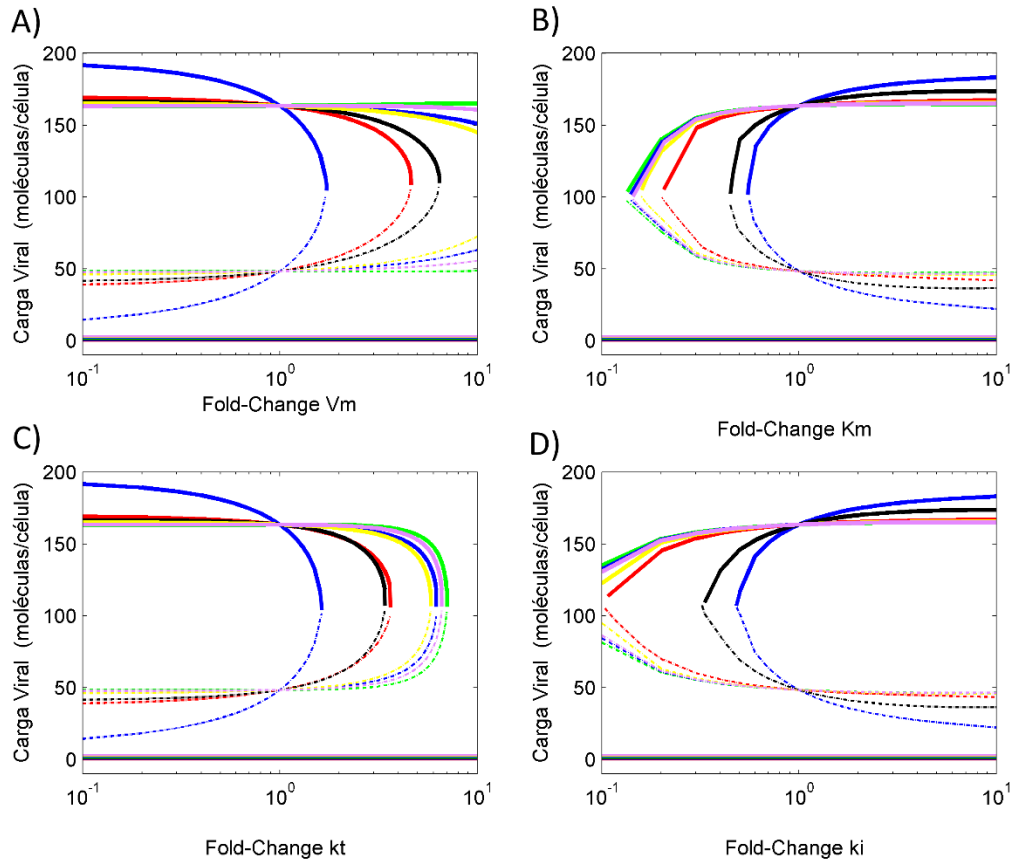


Figura 18 Diagramas de bifurcación de los ARNm y las proteínas ISG.

Diagramas de bifurcación para cada uno de los ISG. Para el mRNA, A tasa de producción y B tasa degradación, para la proteínas ISG C y D producción y degradación respectivamente. El ISG mas sensible en todos los escenarios es la proteína IFITM1

Después de realizar todos los diagramas de bifurcación y determinar que el ISG IFITM1 es quien representa el gen de mayor impacto en la red de señalización para lograr la eliminación del virus, se decide utilizar la tasa de producción del ARNm como parámetro a modificar basados en la literatura y en las técnicas experimentales de transfección reportadas. Cabe resaltar que se realizó el mismo análisis de manera secundario para las demás tasas de producción y degradación.

1.11.6 Diagrama de bifurcación con la sobreexpresión de V_m^{IFITM1}

Una vez que se determinó el valor del parámetro V_m^{IFITM1} para obtener mono estabilidad, se deja fijo este parámetro. Y se realizaron nuevamente los diagramas de bifurcación y se

determinaron los intervalos de biestabilidad y mono estabilidad, todo ello ante variación del mismo parámetro V_m^{ISG} para las seis ISG restantes con una dosis de IFN 100UI.

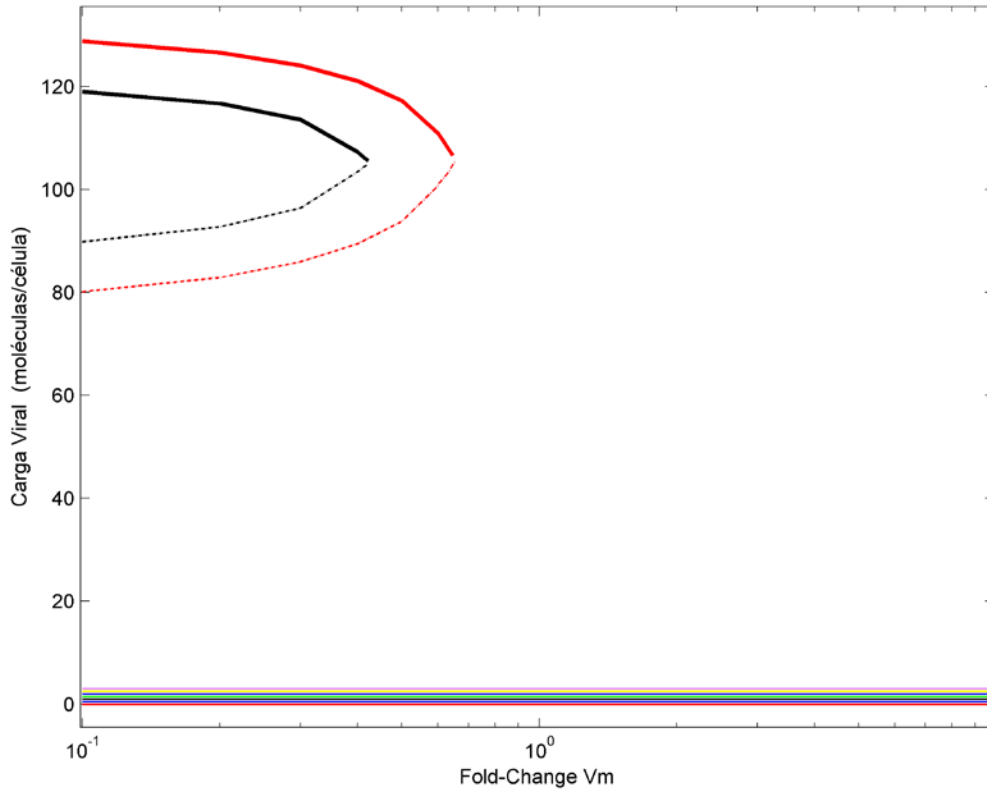


Figura 19 Diagrama de bifurcación V_m^{IFITM1} modificado.

Diagrama de bifurcación para las 6 proteínas ISG. El sistema presenta biestabilidad ante variaciones de únicamente dos parámetros, en color rojo para la ISG IFIT3 y en negro para la IFITM3 y no presenta dependencia de las otras 4 ISG.

Del diagrama de bifurcación de la Figura 19 se puede apreciar que el sistema puede volver a estados biestables y para ello es necesario una baja transcripción de V_m^{IFIT3} alrededor de 60%, y para V_m^{IFIT3} de 40% de su valor basal.

1.11.7 IFITM1 como proteína anti-VHC

En estudios previos (Brass, et al., 2009) (Huang, et al., 2011) se demostró que la familia de las proteínas estimuladas por el interferón IFITM, entre ellas la IFITM1 y sus tres homólogas IFITM2, IFITM3 y la IFITM5 presentan una actividad antiviral en diversos virus, entre ellos el virus de West Nile y el virus del dengue ambos pertenecen a la familia de los flaviviridae y dan indicios a que el IFITM1 es un buen blanco para tratamientos terapéuticos en los flaviviridae.

Se ha demostrado experimentalmente que la sobreexpresión de IFITM1 actúa inhibiendo la replicación del VHC (Raychoudhuri, et al., 2011) (Schoggins, et al., 2011) y no en la entrada del virus como se presumía en (Brass, et al., 2009) (Huang, et al., 2011), también se realizaron experimentos con la proteína ISG56 (IFIT1) que es otra proteína ISG involucrada en la acción anti VHC. Aún se desconoce mucho acerca del mecanismo usado por las proteína ISG para inhibir el virus del VHC (Brass, et al., 2009) (Raychoudhuri, et al., 2011) (Schoggins, et al., 2011).

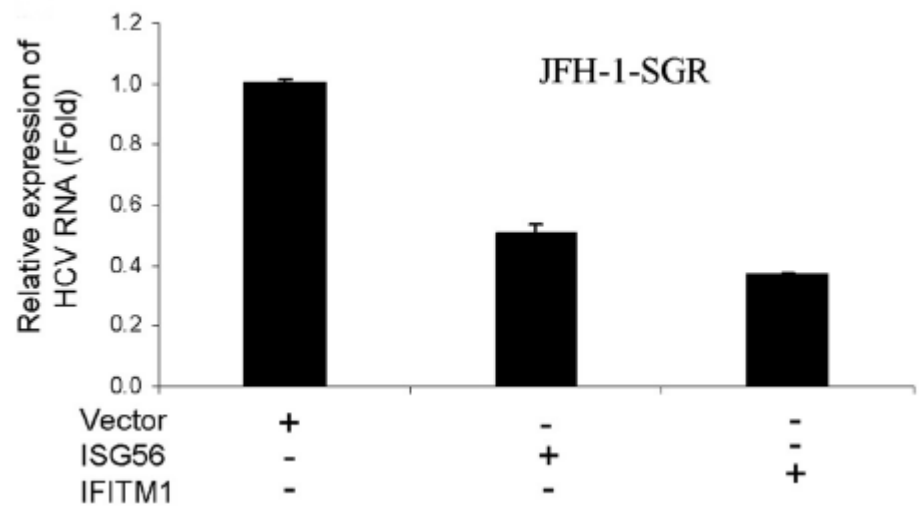


Figura 20 Transfección ISG56 o IFITM1.

Expresión transitoria de IFITM1 o ISG56 suprime la replicación subgenómica del ARN del VHC que contiene el replicón JFH1, los hepatocitos humanos inmortalizados fueron transfectados con vectores de DNA, ISG56 (IFIT1) o IFITM1. El ARN fue extraído del cultivo celular 48 horas pos transfección y se analizó con reverse transcription-quantitative PCR. Los resultados se muestran como la media de 3 experimentos con un error estándar de ($P < 0.003$ para ISG56 y $p < 0.001$ para IFITM1) (Raychoudhuri, et al., 2011).

En dicho trabajo (Raychoudhuri, et al., 2011) se usaron hepatocitos humanos inmortalizados (IHH) y se transfectaron con IFITM1 usando Lipofectamine, sólo con la transfección y sin estímulo del interferón se logra una disminución significativa, de la Figura 20 se aprecia una disminución cercana al 60% de la carga viral. Las células se infectaron con el VHC JFH-1 y posteriormente se transfectaron. 48 horas pos transfección se extrajo el ARN celular y se analizó en PCR cuantitativo (RT-qPCR) (ver Figura 20). Dicho estudio también se realizó con la proteína ISG56 o IFIT1 con una menor eficacia de inhibición del VHC.

El mismo análisis se realizó *in silico* para cada uno de los conjuntos de parámetros, modificando tasas de degradación y producción para ARNm y Proteínas obteniéndose resultados similares. Se decidió trabajar con la tasa de producción del ARNm debido a que ya se han realizado experimentos en cultivos celulares para sobreexpresar las proteínas ISG y así poder validar nuestros resultados, caso contrario con la inserción directa de proteínas ISG o disminución de las tasas de degradación.

1.12 MODELO ESTOCÁSTICO.

Después de validar que el sistema exhibe biestabilidad bajo el análisis determinista, se estudió el efecto del ruido intrínseco en el sistema de reacciones que se muestran en la Tabla 2 para determinar si se presenta una distribución bimodal. Para las simulaciones estocásticas se usó el sistema de reacciones de la Tabla 2 y el método directo del algoritmo de Gillespie (Gillespie, 1977). Para la validación del modelo estocástico se usaron los resultados obtenidos con el modelo determinista.

1.12.1 Hepatocitos infectados por el VHC y respuesta inmune (IFN)

El sistema se resolvió para las condiciones nominales, lo que quiere decir, que se usaron los parámetros de la Tabla 1 y las mismas condiciones experimentales, $\text{moi}=3$. Dieron como resultado una dinámica bimodal lo cual es congruente con las observaciones experimentales (Garaigorta & Chisari, 2010), sin embargo este resultado no es del todo trivial debido a que

sistemas poblacionales pueden ser monomodal a pesar de ser biestable, esto depende de la calidad de switch y las interacciones célula-célula (Shu, Chatterjee, Dunny, Hu, & ramkrishna, 2011) (Cherry & Adler, 2000). En nuestro caso las células se consideran independientes y no interactúan entre sí; son las variaciones intrínsecas en cada célula las que determinan si son células refractarias al IFN y permanecen en estado persistente aunque la respuesta del sistema inmune este presente o por el contrario las células que son sensibles al IFN se van al estado de limpieza.

Las células refractarias son aquellas que al tener una alta respuesta inmune del sistema no logran cambiar de estado o cruzar un umbral para llegar a la limpieza y eliminar el virus, por lo cual estarán en estado persistente todo el tiempo.

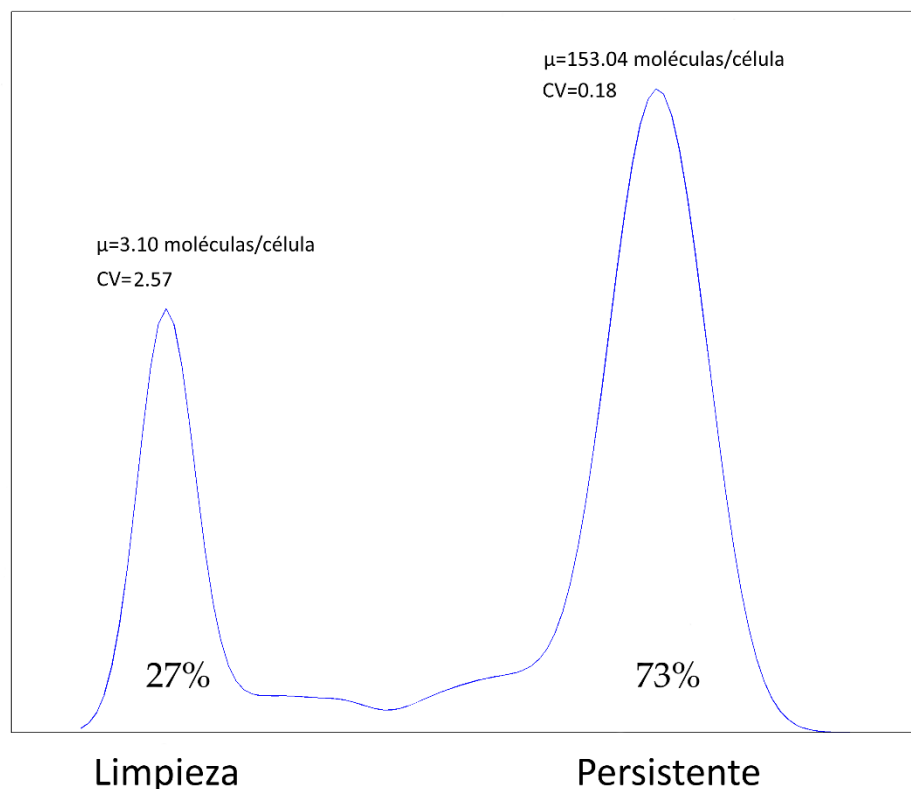


Figura 21 Distribución bimodal.

Distribución bimodal de la simulación de 200 horas del sistema de reacciones que se presenta en la tabla 2 usando los parámetros de la tabla 1.

Para resolver el sistema de reacciones de la Tabla 2 se considera que el hepatocito está previamente infectado con el virus del VHC JFH-1 y con respuesta del sistema inmune, $IFN=100UI$. Una vez que se lleva a cabo la administración del $IFN 100 UI$ que representa la respuesta estándar del sistema inmune, se realiza una simulación por 200 horas con un número total de 500 células y se analiza el tiempo final para obtener un histograma, en este caso es bimodal y cada una de las modas representa un estado estable en el sistema, la limpieza y la persistencia. Los coeficientes de variación son una medida de la dispersión de los datos, que tiene en cuenta la media y la desviación estándar, los valores de la media cercanos a cero en los histogramas explica el valor tan alto de los coeficientes de variación. La primer moda con una media de 3.10 moléculas/Célula con un coeficiente de variación de 2.57 que es el estado de limpieza y la otra moda es el estado persistente con una media de 153.4 moléculas/Célula con un coeficiente de variación de 0.18.

1.12.2 Sobreexpresión de V_m^{IFITM1} en Hepatocitos con respuesta inmune (IFN) bajo la infección del VHC.

Luego de tener la distribución del sistema de propensiones con las condiciones normales (ver Figura 21) se modifica el valor V_m^{IFITM1} y se lleva a sobreexpresión, para ello se multiplico por 1.8, que representa un incremento del 80% en la tasa de producción del ARNm de IFITM1, valor que deterministamente tiene como único estado posible, la eliminación del virus sin importar el tiempo pos infección para administrar el $IFN (100UI)$ o si las células están en estado persistente, resultados similares se han reportado (Garaigorta & Chisari, 2010) los cuales logran sensibilizar nuevamente la célula debilitando el lazo de retroalimentación negativo que ejerce el VHC sobre el ARNm de las proteínas ISG, usando los agentes antivirales de acción directa (DAAs) (in silico), en dicho caso se disminuyó la inhibición del VHC sobre la transcripción de los ISG.

Para nuestro caso en particular, sobreexpresar una sola proteína es suficiente para fortalecer el lazo de retroalimentación negativo que ejercen las proteínas ISG sobre el VHC y limpiar la célula.

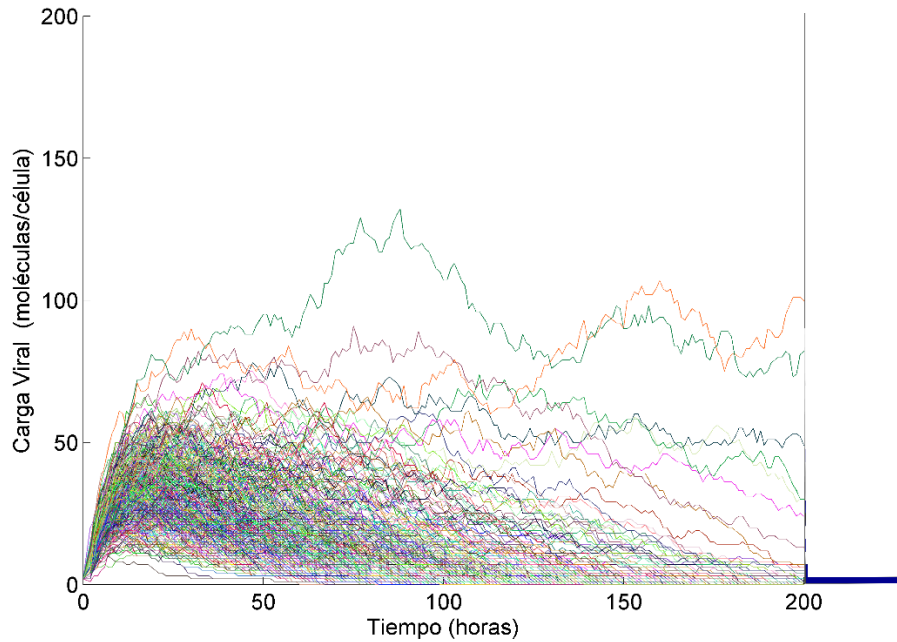


Figura 22 Simulación carga viral baja.

Simulación de hepatocitos infectados por el VHC con carga viral baja (hepatitis C aguda), con IFN (100UI) y sobreexpresión de IFITM1 (80%).

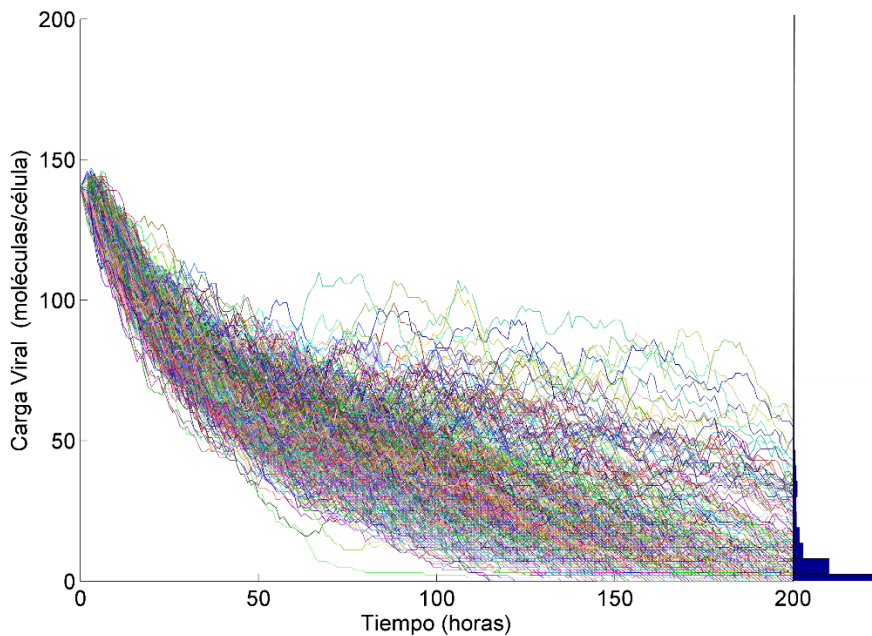


Figura 23 Simulación carga viral alta.

Simulación de hepatocitos infectados por el VHC con carga viral alta (hepatitis C crónica), con IFN (100UI) y sobreexpresión de IFITM1 (80%).

Distribución monomodal obtenida del sistema de reacciones de la Tabla 2 con sobreexpresión del ARNm del IFITM1, se muestra una clara tendencia a la eliminación del virus y posteriormente una respuesta viral sostenida. Las simulaciones fueron realizadas modificando la carga viral inicial y la concentración de dsRNA para emular los diferentes estadios de la enfermedad. Para un estadio de infección aguda se tiene una carga viral baja similar a las reportadas en experimentos con cultivos celulares $R_p = 3 \text{ moléculas/célula}$ y para la hepatitis crónica se usó una carga viral alta y una alta concentración de la hebra doble de ARN del VHC ($R_p = 140 \text{ moléculas/célula}$ y $R_M = 35 \text{ moléculas/célula}$), los tiempos simulados fueron de 200 horas pos-infección.

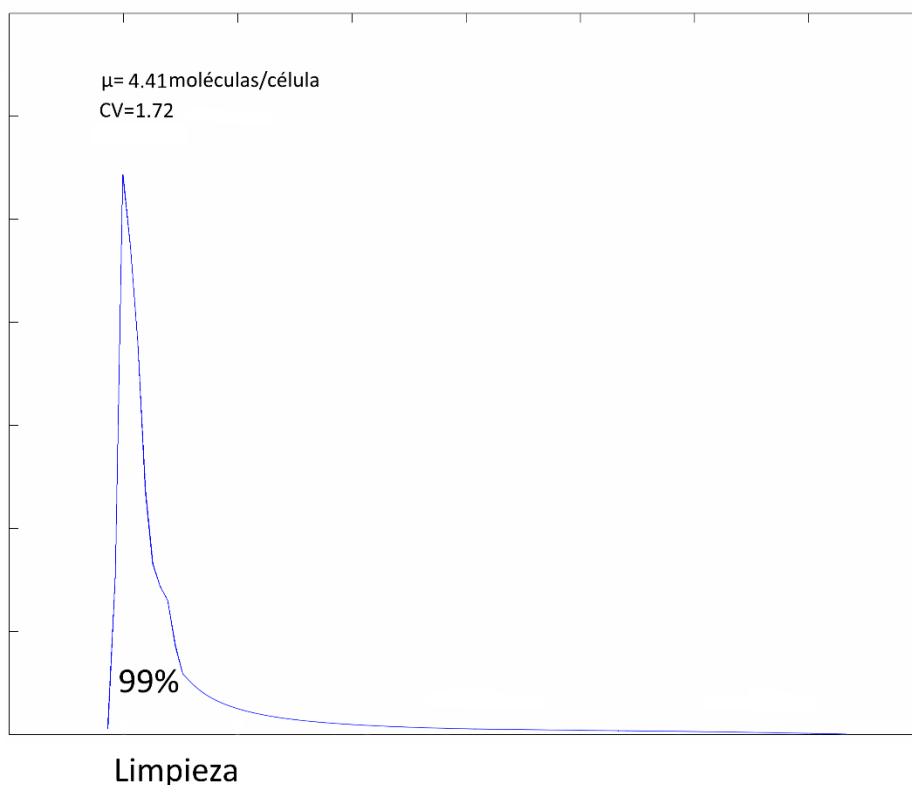


Figura 24 Distribución monomodal.

Distribución monomodal resultado de unir las dos simulaciones previamente descritas en Figura 22 y Figura 23 dando como resultado una distribución monomodal con un valor promedio $4.41 \text{ moléculas/célula}$ y un coeficiente de variación igual a 1.72, estado que corresponde a la limpieza de los hepatocitos, con una población del 99% de las células en el estado de limpieza.

A pesar de la simplificación del modelo se observa una muy buena aproximación a los resultados experimentales por lo cual es posible predecir que la sobreexpresión de una proteína ISG en conjunto con la respuesta inmune innata es un factor determinante en la

limpieza del virus de la hepatitis C, en dicho caso los cultivos celulares pueden ser recuperados de una infección crónica en donde la limpieza espontánea es casi inexistente (Figura 4) contrarrestando la acción del VHC que inhibe la producción de las proteínas ISG. La sobreexpresión de una de las proteínas ISG es altamente controlada debido a la alta especificidad de los receptores al IFN y la vía de señalización JAK-STAT (Hertzog & Williams, 2013).

Mediante las gráficas de bifurcación fue posible modificar el switch, para cambiar de un sistema con histéresis a un sistema con histéresis irreversible (Kim & Cho, 2012), debido a que el nuevo sistema con la modificación de la tasa de producción del ARNm solo admite un estado el cual depende del estímulo (IFN) y de su historia (carga viral) pero una vez que alcanza el estado de limpieza este es permanente y por eso se logra una respuesta viral sostenida.

1.12.3 Modificación de tasas de producción y degradación para ARNm y proteínas.

Para cada uno de los parámetros de producción y degradación se realizaron los diagramas de bifurcación tanto para ARNm como para proteínas, y en todos ellos la proteína IFITM1 presentó mayor sensibilidad, por lo cual, con variaciones pequeñas en dicho parámetro se presenta un mayor cambio en la carga viral comparado con los demás ISG, del mismo modo se realizaron las simulaciones con dichos parámetros.

Usando los diagramas de bifurcación, se determinaron los valores para la monoestabilidad del sistema en el estado de limpieza, después de obtener los valores se modifican las tasas de producción y degradación para el ARNm y las proteínas ISG Figura 25. La tasa de producción de la proteína IFITM1 se aumentó en un 70%, la tasa de degradación se disminuyó en 60% y para la degradación del ARNm se disminuyó en un 50%.

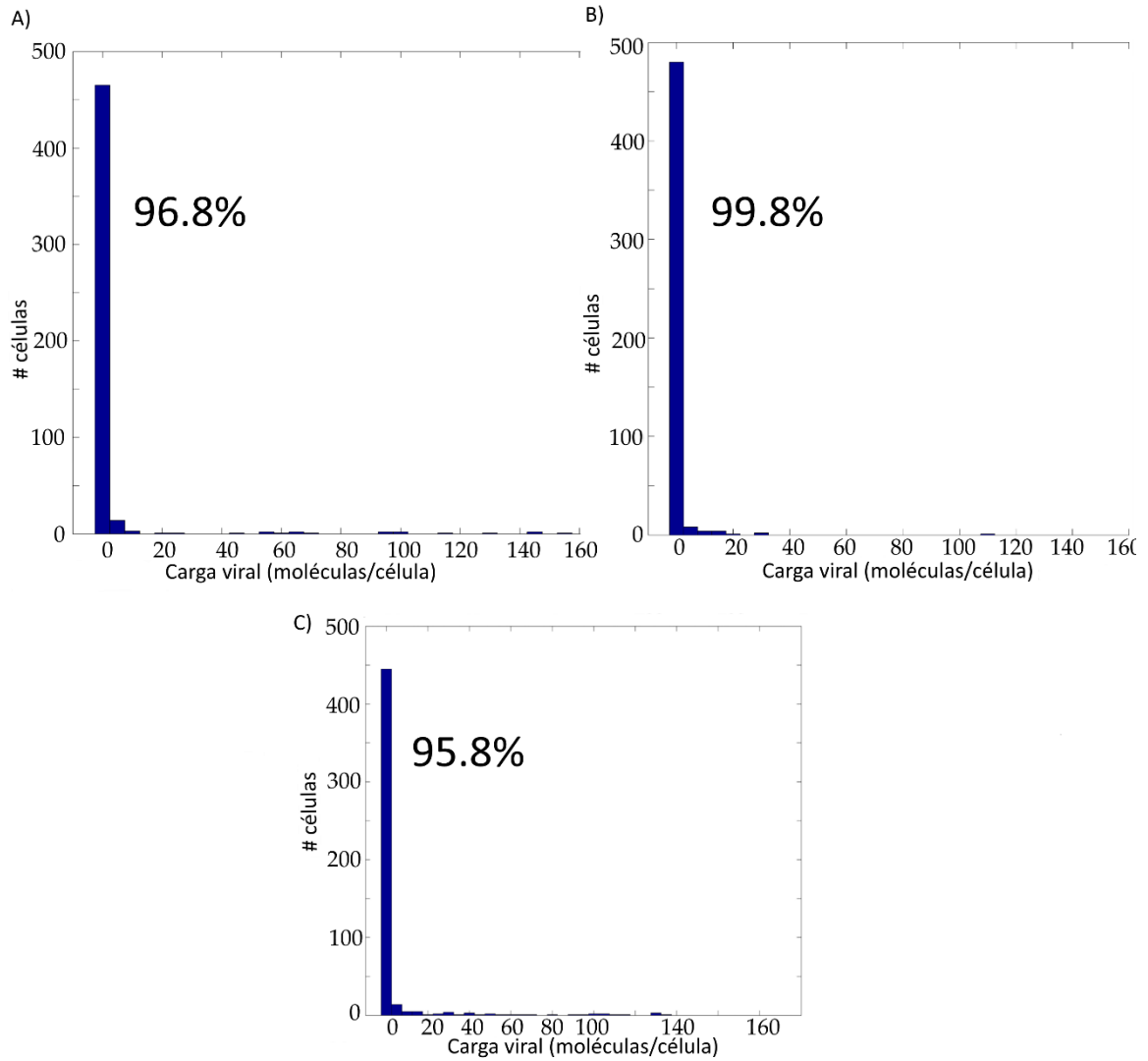


Figura 25 Modificación de tasas de producción y degradación en ARNm y proteínas.

En todas las simulaciones se usó una dosis fija de IFN (100UI) y se modificaron los parámetros de IFITM1, en A) se aumentó la tasa de producción de la proteína en un 70% logrando así una limpieza del 96,8%. En B se redujo en un 40% la tasa de degradación logrando una limpieza del 99.8% y en C se disminuyó la tasa de degradación del ARNm en un 50% logrando una limpieza del 95.8%.

Conclusiones.

En esta tesis se presenta un modelo simplificado y validado de la red del interferón en hepatocitos bajo la infección del VHC con un doble lazo de retroalimentación negativa que exhibe biestabilidad y una distribución bimodal los cuales se ajustaron con modelos in vitro reportados en la literatura.

La red del interferón en los hepatocitos infectados por el VHC no solo requiere una respuesta inmune óptima ($IFN=100$) sino que el tiempo de respuesta del sistema inmune debe ser temprano para que no alcance el estado persistente, una vez que las células llegan al estado persistente no podrán salir de dicho estado por efecto único del IFN.

Se determinó que la proteína IFITM1 es la proteína que presenta un mayor impacto individual sobre la dinámica global del sistema, estudios previos confirman que esta proteína es importante en otros virus de la familia flaviviridae, pero su mecanismo de acción es diferente en el VHC y aún se desconoce mucho. Por lo cual este trabajo es un indicador que esta proteína realmente es importante para ser tomada en consideración como blanco de un tratamiento anti-VHC.

Del análisis in silico para la eliminación del estado persistente del sistema ante variaciones de las tasas de transcripción y degradación para el ARNm de los ISG. Este análisis también se realizó para las tasas de traducción y degradación de las proteínas ISG dando resultados similares, lo cual nos indica que no importa el método usado para sobreexpresar la proteína IFITM1 el resultado es similar tanto a nivel ARNm como a nivel proteína.

Ha sido posible in silico determinar que la sinergia entre la sobreexpresión del IFITM1 y la participación activa del IFN son suficientes para lograr la limpieza de los hepatocitos y tener una respuesta viral sostenida, esto se debe a que el sistema ya no exhibe biestabilidad y por el contrario es monoestable e irreversible, no importa si la carga viral es alta (hepatitis C crónica) o baja (hepatitis C aguda), eventualmente será llevado al estado de limpieza.

Finalmente la sinergia entre el IFN y la sobreexpresión del ARNm del ISG ha sido evaluado bajo condiciones de ruido intrínseco y se determinó que es lo suficientemente estable para que ante fluctuaciones intrínsecas en la transcripción y traducción no alcance niveles de carga viral alta y se obtiene la eliminación del virus y una respuesta viral sostenida, lo cual se ve claramente en la distribución monomodal que nos presenta como único estado posible la limpieza del virus.

A partir de este trabajo se propone un experimento in vitro en hepatocitos infectados por el virus de la hepatitis C, con una respuesta inmune nominal y con la sobreexpresión de IFITM1 que bajo nuestras predicciones permite eliminar el virus de las hepatitis C y lograr una respuesta viral sostenida.

Perspectivas

La implementación de los experimentos con interferón y sobreexpresión de las proteínas ISG permitirían comparar los datos obtenidos mediante nuestro análisis.

La variación de una de las proteínas ISG a la vez, es el escenario más simple en cuanto a combinaciones, para complementar nuestro análisis es de especial interés realizar variaciones en múltiples proteínas a la vez, iniciando en combinaciones de dos en dos, tres en tres hasta obtener finalmente una modificación de las 7 a la vez para determinar umbrales de monoestabilidad y bimodalidad que posteriormente serían sometidas ante variaciones estocásticas.

Referencias

- Agnello, V., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., & Zhang, Q.-X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 12766-12771.
- Angeli, D., Ferrell, J., & Sontag, E. (2004). Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1822–1827.
- Bertoletti, A., & Ferrari, C. (2003). Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology*, 4-13.
- Brass, A. L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., . . . Stephe. (2009). IFITM Proteins Mediate the Innate Immune Response to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus and Dengue Virus. *Cell* 139, 1243–1254.
- Cherry, J., & Adler, F. R. (2000). How to make a Biological Switch. *Journal of Theoretical Biology*:203, 117-133.
- Chevaliez, S., & Pawlotsky, J.-M. (2006). *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience.
- Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A., Overby, L., & Bradley, D. (1989). Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science*, 359-362.
- Dahari, H., Ribeiro, R. M., Rice, C. M., & Perelson, A. S. (2007). Mathematical Modeling of Subgenomic Hepatitis C Virus Replication in Huh-7 Cells. *journal of virology*. 81, 750-760 .
- Dahari, H., Sainz, B., Perelson, A. S., & Uprichard, S. L. (2009). Mathematical Modeling of Subgenomic Hepatitis C Virus Replication in Huh-7 Cells. *journal of virology* , 6383–6390.
- Darnell, J. (1997). STATs and Gene Regulation. *Science*, 1630-1635.
- Evans, M. J., Hahn, T. v., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., . . . Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 801-805.

- Ferrell, J. E., & Xiong, W. (2001). Bistability in cell signaling: How to make continuous processes discontinuous, and. *Chaos* 11, 227.
- Garaigorta, U., & Chisari, F. V. (2010). Hepatitis C Virus Blocks Interferon Effector Function by Inducing PKR Phosphorylation. *Cell Host Microbe*, 513-522.
- Gillespie, D. (1977). Exact Stochastic Simulation of Coupled Chemical Reactions. *Journal of Physical Chemistry*, 2340-2360.
- Han, J.-Q., Wroblewski, G., Xu, Z., Silverman, R. H., & Barton, D. D. (2004). Sensitivity of Hepatitis C Virus RNA to the Antiviral Enzyme Ribonuclease L Is Determined by a Subset of Efficient Cleavage Sites. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 664-676.
- HAROVA, L. V., HAROV, A., EDOREZOV, T. N., IAO, Y. P., HAIK, N. S., & *, M. S. (2009). Database for mRNA Half-Life of 19 977 Genes Obtained by DNA Microarray Analysis of Pluripotent and Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *DNA reserarch*, 45-58.
- Hertzog, P., & Williams, B. (2013). Fine tuning type I interferon responses. *Cytokine & growth factor reviews* 24, 217-225.
- Hoofnagle, J. H., & Seeff, L. B. (2006). Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med*, 2444-2451.
- <http://www.med-ars.it/>. (2015). <http://www.med-ars.it/>. Retrieved from <http://www.med-ars.it/>: <http://www.med-ars.it/>
- Huang, I.-C., Bailey, C. C., Weyer, J. L., Radoshitzky, S. R., Becker, M. M., Chiang, J. J., . . . Kuhn, J. (2011). Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS PATHOGENS* 7, e1001258.
- Ivashkiv, L., & Donlin, L. (2013). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 36-49.
- Karla, H., Nicholas, E., Yip, E., Narayana, S., Li, K., Fiches, G., . . . Michael, B. (2011). The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology*, 1506-1517.
- Karla, J. H., S., E. N., Evelyn, Y., Sumudu, N., Kui, L., Guillaume, F., . . . R., B. M. (2011). The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology* 54, 1506–1517.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., . . . Wakita1, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *Journal of Medical Virology*; 64 (3), 334-339.

- Keum, Park, S., Park, J., Jung, J., Shin, E., & Jang, S. (2012). The specific infectivity of hepatitis C virus changes through its life cycle. *Virology* 433, 462-470.
- Kim, J.-R., & Cho, K.-H. (2012). The regulatory circuits for hysteretic switching in cellular signal transduction pathways. *FEBS journal* 279, 3329-3337.
- Maasoumy, B., & Wedemeyer, H. (2012). Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 401-412.
- Metz, P., Reuter, A., Bender, S., & Bartenschlager, R. (2013). Interferon-stimulated genes and their role in controlling hepatitis C virus. *Journal of hepatology*, 1331-1341 .
- Moradpour, D., Penin, F., & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*, 453-463.
- NCBI. (2015). Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov
- Neumann, A. U., Nancy P., L., Harel, D., & David R., G. (1998). Hepatitis C Viral Dynamics in Vivo and the Antiviral Efficacy of Interferon- α Therapy. *science*, 103-107.
- Padmanabhan, P., Garaigorta, U., & Dixit, N. M. (2014). Emergent properties of the interferon-signalling network may underlie the success of hepatitis C treatment. *Nature Communications* 5, article number: 3872.
- Piero, P., Yasushi, U., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., . . . Abrignani, S. (1998). Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *science*, 938-941.
- Ralf Bartenschlagere, V. L. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *trends in microbiology*, 95-103.
- Raychoudhuri, A., Shrivastava, S., Steele, R., Kim, H., Ray, R., & Ray, R. B. (2011). ISG56 and IFITM1 Proteins Inhibit Hepatitis C Virus Replication. *Journal of virology*, 12881-12889.
- Ribeiro, R. M., Li, H., Wang, S., Stoddard, M. B., Learn, G. H., Korber, B. T., . . . Perelson, A. S. (2012). Quantifying the Diversification of Hepatitis C Virus (HCV) during Primary Infection: Estimates of the In Vivo Mutation Rate. *PLoS PHATOGENS* 8, e1002881.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., . . . Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO JOURNAL*, 5017-5025.
- Scheel, T., & Rice, C. (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature Medicine* , 837-849.

- Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P., & Rice, C. M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481–485.
- Shu, h.-c., Chatterjee, a., Dunny, g., Hu, w.-s., & ramkrishna, d. (2011). bistability versus bimodal distributions in gene regulatory processes from population balance. *PLoS computational biology*:7(8), e1002140.
- Veer, M., Holko, M., Mathias, F., Der, E. W., Jayashree M., P., Robert H., S., & Bryan R. G., W. (2001; 69). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *Journal of Leukocyte Biology*, 912-920.
- Yao, L., Dong, H., Zhu, H., Nelson, D., Liu, C., Lambiase, L., & Li, X. (2011). Identification of the IFITM3 gene as an inhibitor of hepatitis C viral translation in a stable STAT1 cell line. *Journal of Viral Hepatitis*, e523-e529.

Anexos

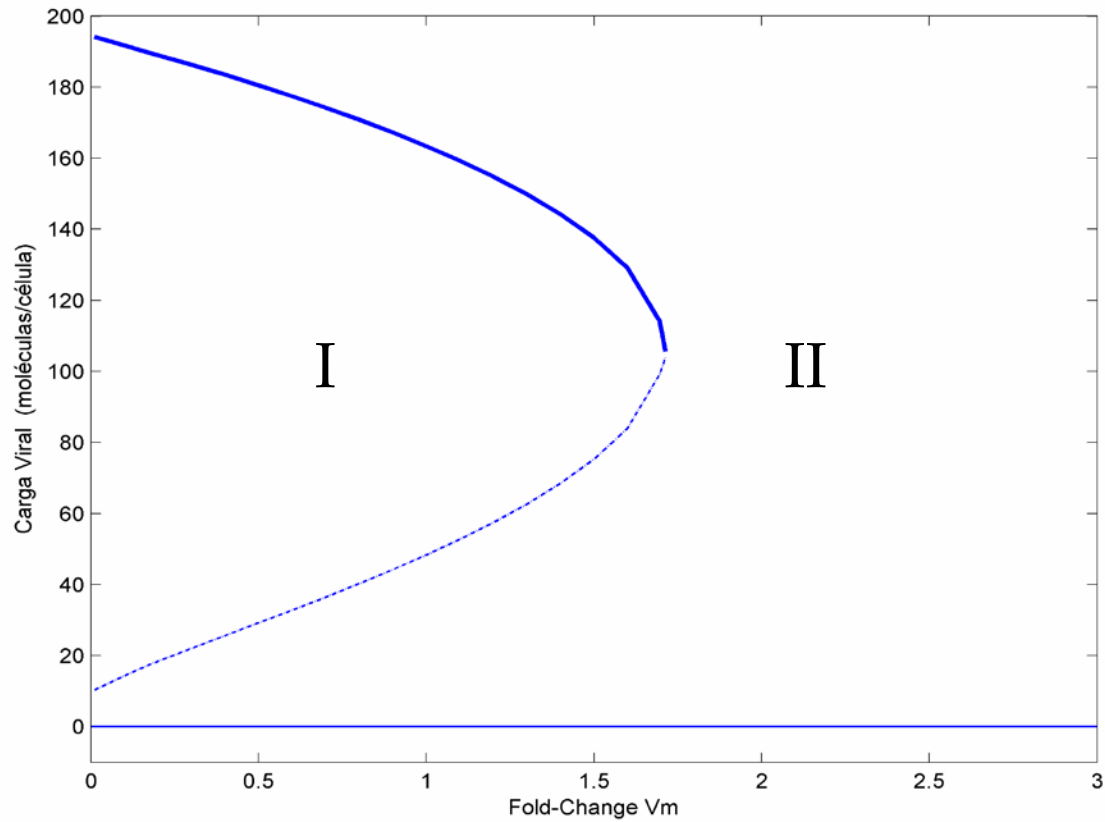


Figura 26 Diagrama de bifurcación IFITM1

Diagrama de bifurcación para la proteína IFITM1 modificando la tasa de producción. Donde se aprecian los estados estables de sistema con una región I que es biestable, del lado izquierdo y una región II monoestable del lado derecho.

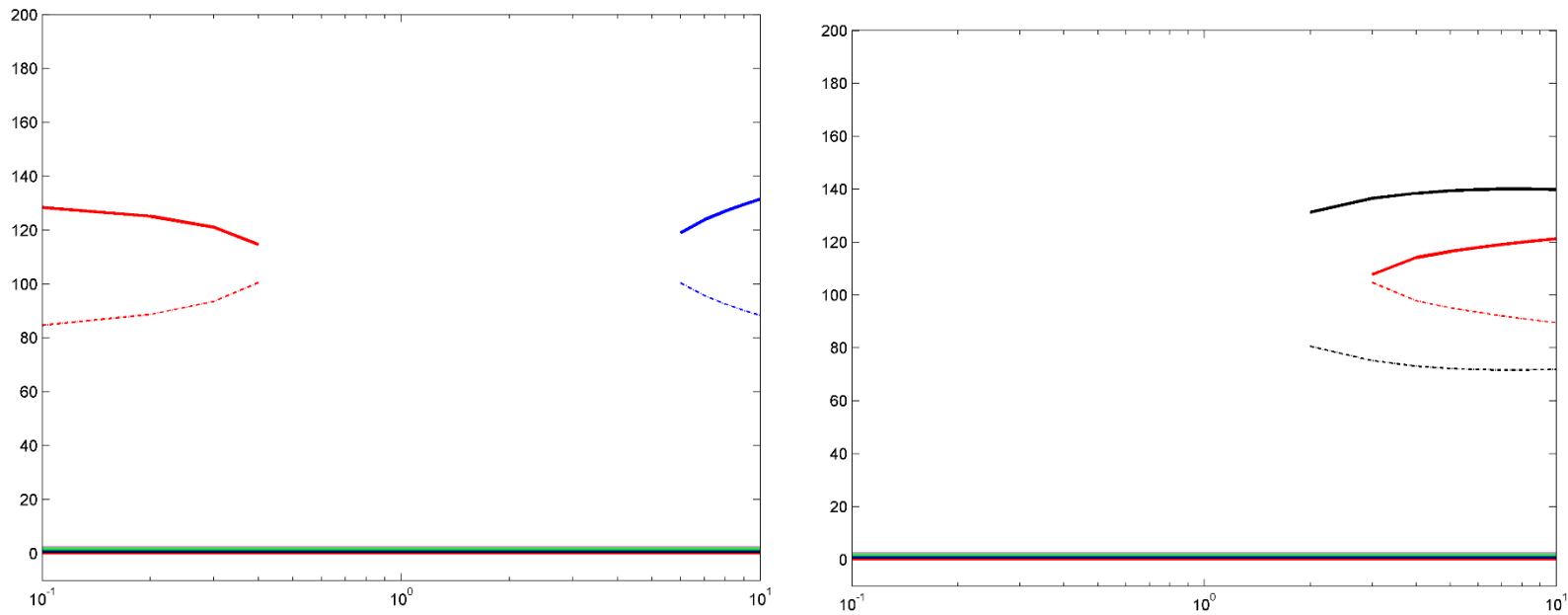


Figura 27 Diagramas de bifurcación ARNm ISG.

Conjunto de diagramas de bifurcación con IFN=100 e IFITM1 sobre expresado un 80% modificando las tasas de producción y degradación del ARNm ISG individualmente. Imagen de la izquierda diagrama de bifurcación para las tasas de producción y la imagen de la derecha para las tasas de degradación.

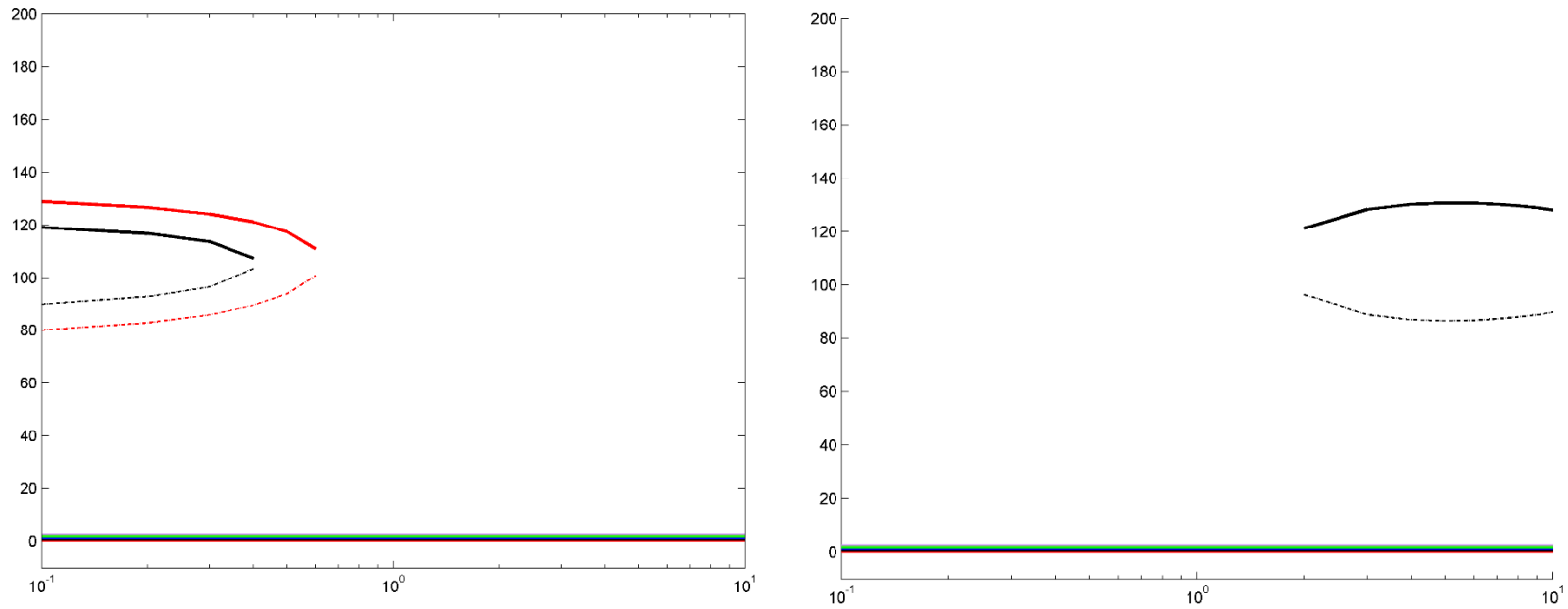


Figura 28 Diagramas de bifurcación Proteína ISG

Conjunto de diagramas de bifurcación con $IFN=100$ e $IFITM1$ sobre expresado un 80% modificando las tasas de producción y degradación de cada proteína ISG individualmente. Imagen de la izquierda diagrama de bifurcación para las tasas de producción y la imagen de la derecha para las tasas de degradación.