























ns	No significativo
p	Probabilidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina(s)
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PPAR	Receptores de activación de la proliferación peroxisomales
TGF- $\beta$	Factor transformador de crecimiento $\beta$
TH	Trasplante hepático
Th1	Linfocitos T helper tipo 1
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TXA	Tromboxano
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

# INTRODUCCIÓN

## **1.- HEPATITIS CRÓNICA: DEFINICIÓN, TIPOS Y PREVALENCIA**

La hepatitis crónica (HC) se define como una enfermedad inflamatoria del hígado de más de 6 meses de duración cuyo sustrato histológico está caracterizado por fenómenos inflamatorios, necrosis celular y, en algunos casos, fibrosis (1).

La etiología es diversa, incluyendo agentes víricos, fármacos y procesos autoinmunes, entre otros. No existen criterios clínicos específicos para el diagnóstico de la enfermedad, lo que exige la utilización simultánea de criterios histológicos y clínicos. El curso de la enfermedad puede ser silente con tendencia a la autolimitación o a permanecer estable, pero también puede evolucionar hacia la cirrosis hepática (CH) (1).

El progresión de una HC puede determinar la aparición de CH y el desarrollo de hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (CHC). La CH es un concepto morfológico definido por la presencia de fibrosis y nódulos de regeneración, siendo una alteración crónica, difusa y, conceptualmente, irreversible del hígado. Las causas de cirrosis hepática más frecuentes en nuestro medio son la infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) (50%) y el alcohol (30%) (Tabla 1). El pronóstico de la CH compensada es bueno a corto plazo (90% de supervivencia a 5 años), pero cuando aparece una descompensación clínica (ictericia, encefalopatía hepática, hemorragia por varices esofágicas o gástricas, y ascitis) o el desarrollo de hepatocarcinoma el pronóstico se ensombrece (2-3).

Tabla 1

ETIOLOGÍA DE LA CIRROSIS HEPÁTICA
Virus de la hepatitis: Virus B y C Alcohol Hepatitis autoinmune Colestasis crónicas (Cirrosis biliar primaria, Colangitis esclerosante primaria, Secundaria a lesión biliar, Atresia biliar) Fármacos Obstáculo al drenaje venoso hepático Enfermedad hepática por depósito de grasa Enfermedades con base genética (hemocromatosis, enfermedad Wilson, déficit de $\alpha_1$ antitripsina...) Criptogénica

La etiología de la HC motivo del estudio del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido la vírica, centrándonos en el VHC, que describiremos a partir del siguiente capítulo de manera más extensa. En relación con las otras causas importantes de hepatopatía crónica en nuestro medio, la infección crónica por el VHB es una de las más importantes, calculándose que existen en el mundo alrededor de 350 millones de personas infectadas. Una tercera parte de la población mundial, aproximadamente, presenta evidencia serológica de infección pasada o presente por el VHB (4). Los países desarrollados, que son regiones de baja prevalencia y en los cuales vive alrededor del 12% de la población mundial, presentan una prevalencia de HBsAg inferior al 2% y menos del 20% de la población algún marcador de infección (5). El consumo excesivo de alcohol, durante un largo periodo de tiempo, produce un amplio espectro de lesiones hepáticas que pueden progresar hasta la CH y el CHC. La relación

entre el consumo excesivo de etanol, principalmente por encima de 80 gr/día, y enfermedad hepática proviene de evidencias epidemiológicas. Estas evidencias demuestran un nexo etiológico entre el consumo elevado de etanol y la aparición de CH, que padecerán entre el 8 y el 20% de los pacientes (6-8). La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), descrita en 1980 por Ludwig y cols (9) como un síndrome anatómico-clínico caracterizado por la presencia de lesiones histológicas hepáticas similares a las de una hepatopatía alcohólica pero en pacientes que no consumen etanol, y que presentan unas características clínicas comunes como la mayor prevalencia en el sexo femenino, en pacientes obesos y en diabéticos. La denominación de EHNA no abarca todo el espectro de la enfermedad, por lo que el término como Enfermedad Hepática por Depósito de Grasa (no alcohólica) (EHDG) se considera más adecuado. La EHDG es un problema médico en aumento en el mundo occidental y su verdadera prevalencia no está bien establecida, estimándose entre el 10 y el 24% de la población general, y la de la EHNA entre el 2 y 3% (10-12).

## **2.- HEPATITIS CRÓNICA POR VHC**

### **2.1.- EPIDEMIOLOGÍA DEL VHC**

La infección por el VHC es endémica en todo el mundo con una prevalencia estimada del 3%, lo que supone alrededor de 170 millones de personas infectadas, aunque la prevalencia varía según las regiones y países (13). En

España la prevalencia es similar a la de otros países europeos, y se encuentra entre el 0,5 y el 2,4% según el grupo de población evaluado (14). El cálculo de la prevalencia de la infección por el VHC a partir de la población donante de sangre probablemente infraestima su verdadera prevalencia al ser una población de bajo riesgo (15). Las cifras de prevalencia pueden variar según el tipo de técnica de determinación de los anticuerpos frente al VHC o del genoma vírico, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se haya realizado y el grupo de edad de los pacientes incluidos en los diferentes estudios. Varios trabajos han encontrado un aumento de la prevalencia de la infección por el VHC con la edad, alcanzando el 10% en pacientes mayores de 60 años (16,17).

El hecho de que la infección por el VHC sea generalmente asintomática implica una dificultad para determinar su incidencia real. Aún así, en un estudio estadounidense realizado sobre población general, se ha señalado una disminución de los nuevos casos de hepatitis C diagnosticados en probable relación al control de los factores implicados en su transmisión (18).

#### 2.1.1.- Vías de transmisión

##### 2.1.1.1.- Vía parenteral

Según los estudios epidemiológicos realizados es la vía de transmisión más eficaz. Los factores de riesgo relacionados son:



a) Adicción a drogas por vía intravenosa

La prevalencia de la infección por VHC en este grupo en España varía desde el 50 hasta el 90% (14). La transmisión de la infección está en relación con la costumbre de compartir las jeringuillas y su adquisición se produce dentro del primer año (19).

b) Transfusión de hemoderivados

Las transfusiones sanguíneas fueron en el pasado el principal factor de riesgo para la infección por el VHC en los países desarrollados, siéndolo aún en los países en vías de desarrollo (20). El riesgo actual se estima en 0,001% por unidad transfundida (21), no habiéndose detectado en Estados Unidos por los CDC de Atlanta (Centres for Diseases Control and Prevention) ningún caso de hepatitis C aguda transmitida por transfusión desde 1994 (15). Los pacientes hemofílicos o con talasemia han sido un grupo de riesgo, dada la politransfusión de hemoderivados a la que son sometidos.

c) Hemodiálisis

Los pacientes sometidos a hemodiálisis presentan una elevada prevalencia de infección por el VHC. En este grupo de pacientes se viene detectando una disminución de la prevalencia de la infección por el VHC hasta un 9,3% en 1997 (22), siendo factores de riesgo además de la politransfusión, el número de años en hemodiálisis, la diálisis peritoneal y la prevalencia de infección por VHC propia de cada unidad.

d) Trasplante de órganos

Los pacientes sometidos a un trasplante de órgano sólido presentan una alta prevalencia de infección por el VHC. Si bien en el trasplante hepático la CH por el VHC es una causa importante de indicación del mismo y en el renal la hemodiálisis previa es un factor de riesgo claro, el propio injerto puede relacionarse con su adquisición tras el trasplante. La infección se transmitirá de manera casi universal cuando un órgano proceda de un donante VHC positivo (23,24).

e) Riesgo ocupacional

Los trabajadores sanitarios presentan una prevalencia similar a la de la población general en contraposición a estudios en los primeros años 90, que sugerían una prevalencia hasta 3 veces superior (15,25). El riesgo de transmisión tras una exposición accidental se ha relacionado con el tipo de aguja y de su potencial contaminación con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (25). La incidencia es baja, estimándose en el 1%, si bien hay estudios que la sitúan alrededor del 10% si se analiza la positividad del ARN del VHC por PCR (26). En un estudio español, publicado en el año 1998, no se detectaron seroconversiones tras el accidente laboral (27).

2.1.1.2.- Otras vías de transmisión

Aproximadamente un 40% de los pacientes con infección por el VHC no refieren antecedentes de riesgo parenteral (28). Diferentes estudios

epidemiológicos han identificado otras vías de transmisión, consideradas como de bajo riesgo, que pueden jugar un importante papel, como son:

a) Vía sexual

Aunque se acepta su relación con la transmisión del VHC su relevancia es pequeña. En un estudio español sobre parejas heterosexuales estables la prevalencia fue del 1,59% (29), mientras que otros autores incrementan la cifra hasta el 5%, pero sin excluir otras vías posibles de transmisión concomitantes (30,31). Se establecen como principales factores de riesgo la edad, un elevado número de parejas sexuales, no usar preservativos, relaciones sexuales traumáticas, la relación homosexual y el antecedente de otras enfermedades de transmisión sexual (15).

b) Transmisión vertical

La transmisión del VHC por esta vía se estima alrededor del 5%. No se ha demostrado influencia del tipo de parto o de la lactancia materna en su transmisión (32,33). La elevada viremia y la coinfección por el VIH de la madre se relacionan claramente con la transmisión del VHC, elevando este último factor la incidencia hasta el 14-17% (33,34).

c) Transmisión intrafamiliar

El riesgo en este grupo proviene del uso compartido de utensilios domésticos y de aseo, y en el caso de las parejas la posibilidad de la transmisión por vía sexual. Los datos son contradictorios y, en conclusión,

parece que su importancia en la transmisión es baja o prácticamente nula (35,36).

d) Miscelánea

La vía de transmisión por punciones percutáneas es poco frecuente y se pone en relación con la ausencia de esterilización del material en casos debidos al afeitado en barberías, a la realización de sesiones de acupuntura, tatuajes o "piercing" (15,19). También se ha descrito, de forma anecdótica, la transmisión tras salpicadura a la conjuntiva de sangre contaminada (37) o tras la realización de una colonoscopia (38).

## 2.2.- HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR EL VHC

El curso evolutivo de la enfermedad hepática por el VHC es variable y puede asociarse con manifestaciones extrahepáticas. Para su descripción podemos distinguir los siguientes escenarios.

### 2.2.1.- Infección aguda

Del 70 al 80% de los casos de infección aguda por el VHC cursarán de forma asintomática, mientras que el resto de los casos presentarán una clínica semejante a una hepatitis aguda por otros virus hepatotrópos. La evolución a hepatitis aguda fulminante es excepcional (39).

Entre el 70 y el 85% de los pacientes evolucionarán hacia la cronificación de la infección y solamente entre el 15 y el 30% de los pacientes resolverán sin secuelas la hepatitis aguda (18,40-42).

### 2.2.2.- Infección crónica

Se considera la evolución a la cronicidad cuando persiste la viremia detectable en el suero, por un periodo de tiempo superior a 6 meses. Se han estudiado los factores relacionados con la evolución a cronicidad de la infección, encontrándose diferencias según la edad, sexo, raza, clínica y estado del sistema inmunitario del paciente en el momento de la infección. Se ha observado una menor tasa de cronicidad en los grupos de menor edad en el momento de la infección y, en especial, en el sexo femenino; mientras que se observa mayor cronicidad en la raza negra (43-46). Se ha identificado que aquellos pacientes que presentan una hepatitis aguda sintomática con ictericia presentan un mayor porcentaje de resolución de la infección respecto a la presentación asintomática (47,48). Los pacientes con infección por el VIH y aquellos con agammaglobulinemia evolucionan a la cronicidad en un porcentaje superior al 90%, lo que sugiere el papel de un estado de inmunodeficiencia como predisposición hacia la cronicidad (49,50).

Una vez establecida la infección crónica por el VHC, se pueden diferenciar dos grupos de pacientes según la concentración sérica de transaminasas. Se ha comprobado que alrededor del 25% de los pacientes con infección crónica por el VHC tienen transaminasas dentro del rango de la normalidad (51,52), así

como una lesión hepática más leve y una menor tendencia a la progresión del estadio fibrótico que los pacientes con transaminasas elevadas (53-55). Existe controversia sobre la evolución más benigna de la infección por el VHC en estos pacientes, puesto que un porcentaje significativo presentan elevación de las transaminasas durante su seguimiento (55).

### 2.2.3.- Cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular

La tasa de progresión hacia la CH oscila entre el 2,1 y el 42% según el tipo de estudio realizado (56). En un estudio reciente, basado en una revisión de la literatura publicada hasta ese momento (57), se calculó una tasa de progresión a CH, tras 20 años de infección por el VHC, del 24% en pacientes con antecedente transfusional, del 22% en series de hospitales, del 7% en estudios poblacionales y del 4% en donantes de sangre. Se identificaron como factores asociados con una más rápida progresión de la fibrosis la adquisición de la infección a una mayor edad, el sexo masculino y la ingesta alcohólica. No existe evidencia del papel de factores dependientes del virus como genotipo, carga vírica sérica y cuasiespecies, en la progresión de la fibrosis, mientras que la coinfección con otros virus (VHB y VIH), la sobrecarga férrica, la obesidad y los factores antes comentados, edad de adquisición e ingesta de alcohol, sí condicionan una mayor rapidez en su progresión, existiendo controversia sobre el papel del sexo en la misma (56,58).

La HC por el VHC es una de las causas más frecuentes de CHC. Este generalmente asienta sobre una CH, en relación con los procesos de lesión,

necrosis, inflamación y regeneración que se producen durante la misma (59). En un estudio realizado en pacientes con CH por VHC, con seguimiento a largo plazo, se evidenció una tasa de aparición de CHC del 13,4% a 5 años (60). La persistencia de transaminasas elevadas durante esta fase de la enfermedad se ha relacionado con la aparición del CHC (61,62).

#### 2.2.4.- Otras manifestaciones de la infección por el VHC

Los síndromes extrahepáticos asociados a la infección crónica por el VHC pueden contribuir de manera significativa a la morbilidad de la infección. La patogenia parece estar mediada por mecanismos autoinmunes. El más frecuente y significativo es la crioglobulinemia mixta esencial y, en segundo lugar, la glomerulonefritis membranoproliferativa, pudiendo ambas expresarse dentro de un mismo síndrome o por separado (63).

Otras manifestaciones reconocidas son la presencia de autoanticuerpos y enfermedad autoinmune hepática, tiroiditis autoinmune, glomerulonefritis membranosa por depósito de inmunocomplejos, manifestaciones dermatológicas como liquen plano, porfiria cutánea tarda o vasculitis asociada a la crioglobulinemia, y el linfoma no Hodgkin B (63-67).

#### 2.3.- HISTOLOGIA DEL VHC

La realización de una biopsia hepática en la HC por el VHC cumple diferentes propósitos como la confirmación del diagnóstico, la evaluación de la

gravedad de las lesiones necroinflamatorias y fibrosas, el despistaje de posibles procesos concomitantes y la valoración de la respuesta terapéutica (68).

Las lesiones histopatológicas de una HC por VHC no son patognomónicas, pero el infiltrado linfocitario sinusoidal, la degeneración acidófila y los agregados linfoides portales son en conjunto bastantes específicos de la infección crónica por el VHC (69).

En 1981 Knodell y cols (70) introdujeron el primer sistema descriptivo semicuantitativo y reproducible de las lesiones histológicas de las HC víricas y que sirve todavía hoy de referencia. De este modo, se propuso una metodología, una terminología y el desarrollo de un sistema para la evaluación de la progresión y la respuesta al tratamiento en biopsias seriadas de pacientes con HC. El sistema se basa en 3 categorías para las lesiones necroinflamatorias (periportal, portal y lobulillar) y una categoría para la fibrosis, cuya suma produce un índice global de actividad (Índice de actividad histológica). Según se ha progresado en el conocimiento de las HC se han propuesto nuevos sistemas para la valoración del grado inflamatorio y del estadio fibrótico propuesto por Knodell y sus colaboradores.

La descripción de la lesión se expresa según el "grado" que se refiere a la lesión necroinflamatoria que indica la actividad de la enfermedad hepática y es el parámetro potencialmente con mayor respuesta al tratamiento, y el "estadio" en relación con la fibrosis que indica la progresión a largo plazo de la enfermedad (68). Basados en esta clasificación histológica de la lesión hepática los principales sistemas que se han desarrollado posteriormente son el de Ishak (71), la modificación del índice de actividad histológica de Knodell por los



mismos autores (72), el METAVIR (73) propuesto para la valoración de la HC por el VHC y el sistema de Scheuer (74) descrito originalmente para HC víricas pero también utilizado para HC no víricas, que da el mismo peso a la afectación portal y lobulillar, agrupando la lesión portal y periportal en una categoría, y que para algunos autores es el que mejor refleja las lesiones en la HC por el VHC (75,76) y que es el que se ha utilizado en el presente trabajo de Tesis Doctoral (Tabla 2). Un sistema posterior propuesto por Ludwig y cols (77) es similar al de Scheuer.

**TABLA 2**

Sistema para la clasificación de las hepatitis crónicas de Scheuer

	<b>Actividad necroinflamatoria</b>	
<b>Grado</b>	<b>Actividad portal/periportal</b>	<b>Actividad lobulillar</b>
<b>0</b>	No inflamación portal	No inflamación lobulillar
<b>1</b>	Inflamación portal	Inflamación sin necrosis
<b>2</b>	Necrosis erosiva leve	Necrosis focal
<b>3</b>	Necrosis erosiva moderada	Necrosis focal moderada o grave
<b>4</b>	Necrosis erosiva intensa	Necrosis en puentes
	<b>Fibrosis</b>	
<b>Estadio</b>		
<b>0</b>	No fibrosis	
<b>1</b>	Fibrosis portal	
<b>2</b>	Septos (arquitectura intacta)	
<b>3</b>	Septos (arquitectura distorsionada)	
<b>4</b>	Probable o definitiva cirrosis	

## 2.4.- PATOGENIA DE LA LESIÓN HEPÁTICA POR EL VHC

### 2.4.1.- Inflamación

La patogenia de la lesión necroinflamatoria inducida por el VHC reside en un mecanismo inmunológico a través de una respuesta inmune humoral, y celular inespecífica (mediada por células natural killer) y específica frente a diferentes antígenos o proteínas víricas (78). La cronicidad de la infección parece residir en la capacidad del VHC en evadir la respuesta inmunológica y en la intensidad de la respuesta inmune celular, tanto a nivel de los linfocitos cooperadores Th1 como de los linfocitos T citotóxicos específicos frente al VHC (79).

Durante el proceso inflamatorio desencadenado en el hígado por la infección por el VHC, se producen quimioquinas y citoquinas proinflamatorias que activan a las células del endotelio vascular, aumentando la expresión de moléculas de adhesión en su membrana. Las 3 moléculas de adhesión principales son ELAM-1 (molécula de adhesión endotelial para leucocitos), ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular) y VCAM-1 (molécula de adhesión a células vasculares), siendo esta última la fundamental para la adhesión al endotelio de los linfocitos, mediante su interacción con la integrina VLA-4 de la membrana linfocitaria (79). Estas moléculas de adhesión participan en el reclutamiento y migración de los linfocitos T específicos desde el espacio intravascular al parénquima inflamado (80). Se ha demostrado que la expresión de VCAM-1 aumenta en las células sinusoidales de forma paralela al aumento

de la intensidad de la lesión hepatocelular (81). También se ha descrito la neoformación de microvasos en los espacios porta de pacientes con HC vírica, lo que sugiere su relación con la respuesta inflamatoria y establecería un factor facilitador de la extravasación y reclutamiento de linfocitos, aunque su significado definitivo es aún desconocido (82).

Posteriormente los linfocitos reclutados protagonizan la respuesta inmune celular específica, que se puede describir en cuatro fases. En la primera fase, de adhesión celular, se produce la interacción de las células presentadoras de antígeno, células diana y linfocitos efectores a través de las moléculas de adhesión intercelular. Entre estas ICAM-1, expresada en la membrana de la célula diana, media la adhesión del linfocito efector, siendo un paso determinante para el inicio de la respuesta inmune celular. Además se ha demostrado la relación de su expresión con el grado de actividad necroinflamatoria en las áreas periportal y lobulillar, en pacientes con HC por el VHC y su modulación con el tratamiento antivírico (83). En un segundo paso, se produce el reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos de los antígenos víricos expresados en la membrana de las células diana en conjunción con los antígenos HLA de clase I. Este requisito es imprescindible para la activación de los linfocitos T citotóxicos y posterior lisis de los hepatocitos infectados, que conforma la tercera y cuarta fases de la respuesta inmune celular (79). Las citoquinas producidas y liberadas como consecuencia del proceso inflamatorio van a participar en la perpetuación del daño tisular, como ocurre con el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (84). Otras moléculas,

como la óxido nítrico sintasa inducible (NOS-2), han sido implicadas en la patogenia del proceso inflamatorio (85).

Estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de nexos de unión entre la inflamación y la fibrogénesis en la HC por el VHC. Así se ha demostrado una correlación directa entre los niveles de VCAM-1 soluble y los índices de fibrosis hepática (86), y el proceso de neoformación vascular con la producción de endoglina por las células endoteliales, que sirve de receptor para el factor transformante del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) (82).

#### 2.4.2.- Fibrosis

Fibrosis hepática es un término histopatológico que se refiere al acúmulo de proteínas fibrilares en la matriz extracelular (MEC), con o sin inflamación acompañante, y de forma localizada o difusa en el parénquima hepático. La extensión de este proceso, con la formación de puentes que conectan áreas portales y centrales, que finalmente conforman densas bandas que engloban nódulos de hepatocitos, da lugar a la CH (87).

La fibrosis hepática es uno de los cambios histopatológicos más característicos de las hepatopatías crónicas indicando su gravedad independientemente de la etiología (88).

#### 2.4.2.1.- La matriz extracelular normal

La MEC es un compartimento muy limitado en el hígado normal. La MEC se refiere al conjunto de macromoléculas que conforman el andamiaje del hígado, y se halla restringida al espacio entre el hepatocito y el endotelio vascular, denominado espacio de Disse, en los espacios porta, alrededor de las venas centrales y en la cápsula hepática. La MEC contribuye a la formación de las membranas basales, a la estructura del lobulillo y de los espacios porta, en suma a la integridad estructural del hígado (87,89,90).

En la composición de la MEC se distinguen diferentes proteínas que clásicamente se han agrupado en colágenos, glicoproteínas y proteoglicanos. Entre los colágenos podemos diferenciar dos clases moleculares principales: las especies fibrilares (I, II, III, V y XI) y los no fibrilares que son un grupo heterogéneo y que puede ser subdividido según su función y localización tisular.

A nivel del espacio sinusoidal se encuentran los colágenos de las especies fibrilares tipo I, III, y V, y los colágenos no fibrilares tipo IV, VI y XVIII. Entre las glicoproteínas más importantes se hallan la fibronectina y la laminina. Los proteoglicanos son moléculas encargadas de regular el ensamblaje de la MEC estabilizando su arquitectura, y tienen un papel importante en la organización espacial de los polímeros estructurales, siendo el más importante en la MEC perisinusoidal el heparán sulfato. Esta MEC de baja densidad es fundamental para el mantenimiento de las funciones diferenciadas de las células residentes en el hígado, los hepatocitos, las células del endotelio vascular y dos tipos

celulares muy importantes que se encuentran en el espacio de Disse, entre las células del endotelio vascular y los hepatocitos, las células de Kupffer, que son parte del sistema reticuloendotelial del organismo y con un papel relevante en los procesos inflamatorios hepáticos, y las células de Ito, perisinusoidales o estrelladas (CE). Estas células son lipocitos que acumulan vitamina A y que al activarse se transforman en miofibroblastos, y producen colágeno en respuesta a estímulos inflamatorios (87,89-92).

#### 2.4.2.2.- La matriz extracelular en la fibrosis hepática

La respuesta al estímulo fibrogénico se produce en cuatro fases secuenciales y solapadas (93) que van desde la formación del infiltrado inflamatorio y activación de las CE, la alteración de la MEC local, la migración y proliferación de las CE y la fase final con el depósito de una MEC densa.

De entre todos los mecanismos fisiopatológicos que provocan la fibrosis hepática, el eje central es la activación de las CE que podemos separar en dos fases: iniciación y perpetuación, que se refieren a la conversión de las células quiescentes en miofibroblastos contráctiles, fibrogénicos y proliferativos (90,94).

##### 2.4.2.2.1.- Iniciación

Este primer paso en la activación de las CE está asociado con rápidos cambios en la expresión de genes que favorecen la respuesta de las células a

las citoquinas y factores de crecimiento (90). Así, los cambios iniciales en las CE reflejan la acción estimuladora paracrina de diferentes citoquinas y quimioquinas, liberadas por células de Kupffer, del infiltrado inflamatorio, endoteliales y hepatocitos. También intervienen en esta fase los radicales superóxido y los productos de la peroxidación lipídica, que se liberan de los hepatocitos dañados y por las células de Kupffer y del infiltrado inflamatorio (95).

A su vez los linfocitos que residen en el hígado y los del infiltrado inflamatorio secretan citoquinas, observándose en modelos experimentales que una respuesta Th2 favorece la fibrogénesis respecto a la Th1. Además intervienen diferentes citoquinas y factores de crecimiento (PDGF, TGF- $\beta$ , TNF $\alpha$ , IGF-1, EGF, IL-6) que favorecen tanto la mitogénesis como la fibrogénesis. El factor regulador o inhibidor de la activación de las CE es el IFN $\gamma$ . La lesión sobre las células del endotelio vascular va a desencadenar la liberación de fibronectina y una cascada de señales intracelulares que provocan proliferación, migración y activación celular. Las quimioquinas juegan un importante papel en la migración y posterior activación de las CE, y se ha demostrado en este proceso la importancia de la activación del factor nuclear kappa-B (NF-kB), que actúa como activador de la transcripción de genes proinflamatorios en las células de Kupffer principalmente (94,96-98).

#### 2.4.2.2.2.- Perpetuación

En esta fase se produce un cambio del aspecto morfológico de las CE a miofibroblastos, así como cambios funcionales detectables como son la disminución del retinol intracelular, expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso, la expresión de receptores para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y un aumento de la proliferación celular y la producción de componentes de la MEC (91,94,95,98). Este cambio fenotípico de las CE será mantenido y amplificado por la remodelación de la MEC, que comentaremos en el siguiente punto, y por mecanismos de perpetuación que describimos a continuación (90).

El incremento del número de CE durante el daño hepático refleja la activación de factores mitogénicos, que estimulan la proliferación y la migración de las CE activadas. El PDGF es el estímulo proliferativo más potente para las CE activadas además de poseer una actividad quimiotáctica junto al factor de crecimiento derivado de la insulina (IGF-1) (94,98).

El aumento de la producción de componentes de la MEC por las CE activadas está mediado principalmente a través de la acción del TGF- $\beta$  (94,98,99). La activación de las CE conlleva un gran incremento de su capacidad contráctil que produce un progresivo aumento de la resistencia al flujo de la sangre y finalmente el aumento de la presión portal del hígado cirrótico (94,98). Este aumento de la contractilidad de los miofibroblastos parece ser proporcional al grado de la lesión hepática. Las células endoteliales y las CE son los elementos más importantes en la regulación de la resistencia



intrahepática, estando ambas células asociadas a través de secreción de sustancias con acción paracrina, como la liberación de óxido nítrico (NO) por las células endoteliales y su efecto relajante sobre las CE, o de la endotelina y su efecto vasoconstrictor. Estas sustancias parecen tener también acción sobre la fibrogénesis hepática (90,100)

Otros eventos son la pérdida del retinol intracelular, proceso cuya implicación en la activación de las CE no se conoce con exactitud, y la liberación de citoquinas con acción reguladora de su activación y otras con acción quimiotáctica sobre células inflamatorias (94,98).

Los miofibroblastos aumentan la síntesis y secreción de componentes de la MEC durante todo el proceso. Se producen cambios cualitativos como el predominio del colágeno I, sobre el III y el IV, que también se encuentran incrementados (88). Esto conlleva la modificación de una matriz de baja densidad subendotelial a una fibrilar rica en colágeno lo que afecta al comportamiento de hepatocitos, células del endotelio vascular y CE. Según persiste el daño, la fibrosis se va convirtiendo en un fenómeno cada vez menos reversible, por el refuerzo de las uniones covalentes entre las proteínas de la MEC. Si la noxa desaparece, el mismo sistema que lleva a la formación de la fibrosis produciría la remodelación de la MEC y eliminación del exceso de proteínas y de células con el posible restablecimiento de la arquitectura tisular normal (93). A nivel tisular observaríamos un descenso de las CE activadas cuyo mecanismo no se conoce todavía bien, pero que dependería de una regresión a un estado quiescente o de mecanismos de apoptosis (94,98).

#### 2.4.2.2.3 Remodelación tisular y Metaloproteinasas

La MEC es un medio dinámico y su alteración está implicada a su vez en la activación de las CE. Tanto la nueva síntesis de proteínas de matriz como la degradación de la MEC, por parte de las metaloproteinasas (MMPs), producidas en gran parte por las propias CE, van a ser importantes en este sentido. Además, la degradación de la MEC comporta la liberación de citoquinas retenidas en ella y su recuperación funcional (93,94,98).

Las MMPs son una familia compuesta de diferentes enzimas, calcio y zinc dependientes, liberadas en forma inactiva desde las células y que se clasifican en 5 grandes grupos según su sustrato más específico: colagenasas intersticiales (MMP-1, MMP-8), gelatinasas (MMP-2, MMP-9), estromelinasas (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11), tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) y metaloelastasas (MMP-12). Las MMP-2 y MMP-9 son de especial importancia en la fibrogénesis hepática al hallarse involucradas en la degradación de la membrana basal de baja densidad del espacio de Disse (90,101).

En la activación y regulación de las MMPs se encuentran implicadas múltiples proteínas, como la plasmina o el TGF- $\beta$ 1, dentro de un complejo mecanismo según cada tipo de MMPs. En la regulación extracelular de la actividad de las MMPs las moléculas más importantes son los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) (90,101). Diversos estudios, tanto a nivel experimental como en muestras de pacientes con HC, han demostrado la

relación entre el aumento de la expresión y la activación de diferentes MMPs y la progresión de la fibrosis hepática en la HC por el VHC (102-104).

#### 2.4.3.- Hepatocarcinogénesis

Se han identificado diferentes factores de riesgo de CHC como la infección crónica por el VHB y el VHC, que suman más del 80% de los casos de CHC en el mundo. Otros factores son la exposición a la aflatoxina B<sub>1</sub>, el tabaquismo y el consumo de alcohol. Enfermedades genéticas como la hemocromatosis, la porfiria o el déficit de  $\alpha_1$ -antitripsina también suponen un factor de riesgo. En todo caso, la CH por sí misma y de cualquier etiología, es un factor de riesgo de CHC ya que al menos del 60 al 80% de los CHC se desarrollan sobre una CH. Esto podría sugerir la existencia de diferentes vías patogénicas para el CHC que aparece sobre un hígado cirrótico o en un hígado sin cirrosis (105,106).

La carcinogénesis se entiende como un proceso con múltiples etapas que se van acumulando hasta llegar al tumor maligno y su diseminación. En el caso del CHC el daño hepático crónico por diferentes causas produce inflamación, muerte celular, regeneración celular y cirrosis, daño del ADN, displasia y finalmente CHC (106). Esta actividad necroinflamatoria en el hígado y el posible desarrollo de CH, produce cambios a nivel genético con activación de proto-oncogenes e inactivación de genes supresores. Los efectos que se observan derivados de estos cambios genéticos son defectos en el control proliferativo celular y en la muerte celular programada (apoptosis), resistencia a

quimioterápicos, defectos en la diferenciación celular y adquisición de capacidades angiogénicas y metastásicas (105).

El estrés oxidativo y la inflamación crónica se han asociado a un aumento del riesgo de cáncer. La hipótesis es que la generación de especies reactivas derivadas del estrés oxidativo causa mutaciones en genes relacionados con el cáncer o altera la función de proteínas que intervienen en la regulación de la reparación del ADN, del ciclo celular y la apoptosis (105,106). Etiologías que producen acumulación del hierro o del cobre intrahepático generan especies reactivas derivadas del oxígeno o del nitrógeno que producirían el daño comentado, siendo uno de los genes más frecuentemente afectados el p53, gen supresor por excelencia. En el caso de etiologías víricas como el VHB, la acción sobre el genoma celular por la integración del gen HBx o bien de la proteína, altera la acción de genes como el p53 inactivando la apoptosis o la reparación de nucleótidos dependientes de p53 (105). En el VHC no se conoce bien su posible mecanismo pro-oncogénico, aunque es en esta etiología donde, casi de forma invariable, el CHC se produce sobre una CH de base. En todo caso existen evidencias de la interacción del VHC con genes reguladores de la proliferación y la diferenciación celular (107).

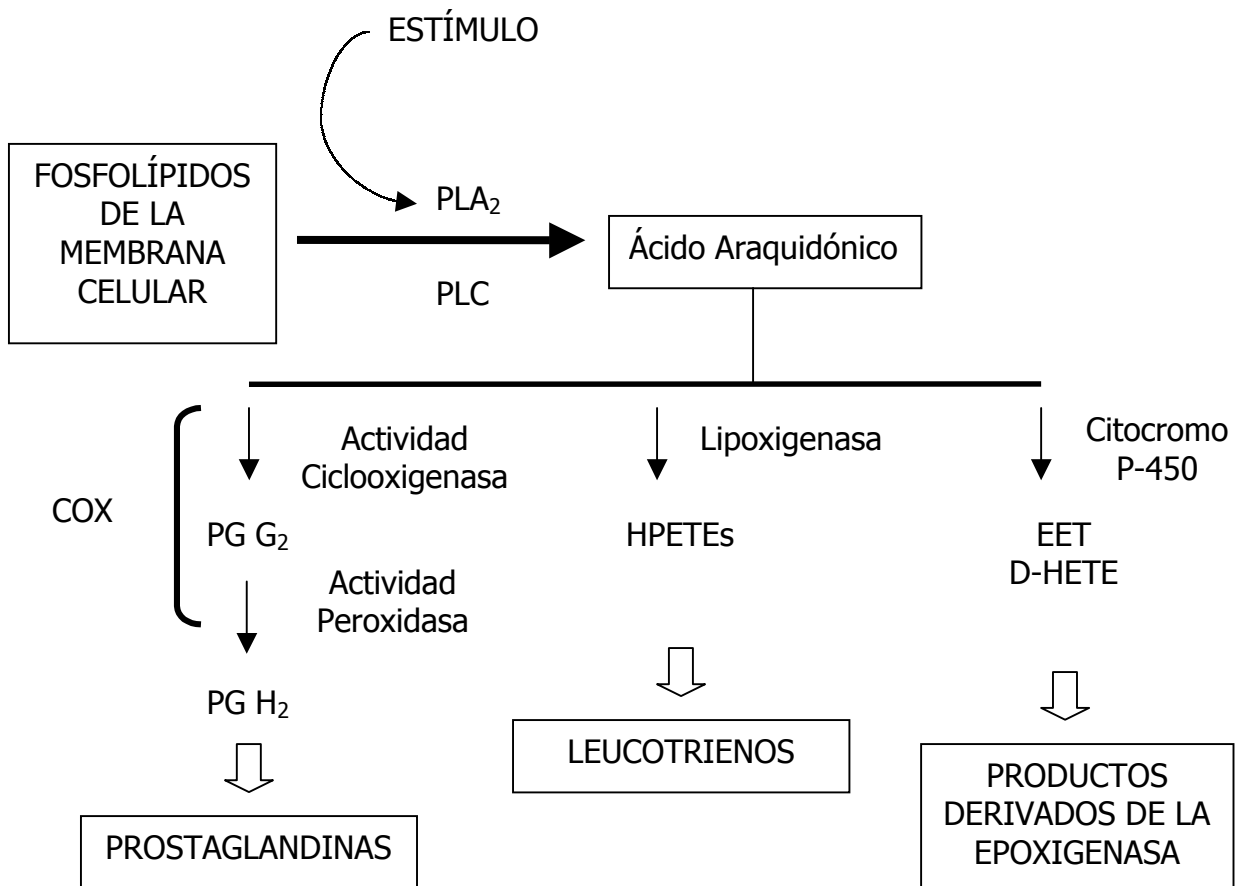
### 3.- METABOLISMO DE LOS EICOSANOIDES

Los productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico (AA) se denominan de forma colectiva eicosanoides. Estos compuestos afectan a múltiples vías de señalización intracelulares que modulan un amplio espectro de funciones fisiológicas como la inflamación, la ovulación, la respuesta inmune y la mitogénesis (108,109).

#### 3.1.- ÁCIDO ARAQUIDÓNICO Y LIBERACIÓN DESDE LA MEMBRANA CELULAR

El primer paso en la producción de eicosanoides es la liberación del AA de la membrana fosfolipídica por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) en respuesta a diferentes estímulos (bradiquinina, angiotensina II, trombina, histamina, leucotrienos (LT), citoquinas, factores de crecimiento) y la fosfolipasa C que cataliza la formación de AA y glicerol a partir de los fosfolípidos liberados de la membrana celular. La actividad de las fosfolipasas es el paso limitante que condiciona la velocidad de síntesis de los eicosanoides (108).

Una vez liberado el AA puede volver a la membrana como fosfolípido, difundir al medio extracelular sin causar efecto alguno o ser metabolizado por diferentes sistemas enzimáticos como el de la ciclooxigenasa (COX), la lipoxigenasa (LPO) y el del citocromo P-450, que catalizan la síntesis de prostaglandinas (PG), LT, y productos derivados de la vía de la epoxigenasa, respectivamente (Figura 1) (108).



HPTE: Ácido hidroxiperoxieicosatetraenoico; EET: Ácidos epoxieicosatrienoicos; D-HETE: Ácidos hidroxieicosatetraenoicos.

FIGURA 1: Metabolismo del ácido araquidónico

### 3.2.- VÍA DE LA CICLOOXIGENASA: SÍNTESIS DE PROSTANOIDES

#### 3.2.1.- Actividades enzimáticas de la ciclooxigenasa

La COX o prostaglandina endoperóxido-sintetasa (PGH-sintetasa) cataliza la transformación del AA a PGH<sub>2</sub>. La PGH-sintetasa posee dos actividades catalíticas, la primera ciclooxigenasa que produce un endoperóxido intermedio denominado PGG<sub>2</sub>, sobre el cual actúa la segunda actividad catalítica que es una peroxidasa y la transforma en PGH<sub>2</sub> (108).

A partir de la PGH<sub>2</sub> por acción de diferentes endoperóxido isomerasas se sintetizan la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y los tromboxanos (TXA) dependiendo de la maquinaria enzimática presente en los diferentes tipos celulares (108,110).

#### 3.2.2.- Mecanismo de acción de los prostanoides

Las PG ejercen su acción bien a nivel intracelular, a través de receptores nucleares como los de clase PPAR (receptores de activación de la proliferación peroxisomal) que actúan como factores transcripcionales tras la unión al ligando (110,111), o como mediador paracrino, donde su acción es consecuencia de la interacción con diferentes receptores de las membranas celulares asociados a proteínas G. En la mayoría de los casos, la interacción con su receptor desencadena la activación del sistema adenilciclasa, con el

aumento de AMPc, o de la fosfolipasa C y aumento de la concentración de calcio intracelular y diacilgliceroles (108).

### 3.2.3.- Efectos de los prostanoides

Los eicosanoides son producidos en casi todas las células, por tanto están involucrados en la mayoría de las funciones orgánicas. En el caso de los productos derivados de la acción de la COX, las funciones más importantes en las que intervienen son:

- En el proceso inflamatorio con acción a nivel vascular produciendo vasodilatación y aumento del flujo sanguíneo local. Favorecen la acción de otros mediadores, como la bradiquinina, que favorece el aumento de la permeabilidad vascular. Además a nivel del sistema nervioso central desempeñan un papel importante en la génesis de la fiebre y en el sistema nervioso periférico sensibilizan las terminaciones nociceptivas produciendo hiperalgesia localizada (108,110,111).

- En el lecho vascular ejercen importantes acciones sobre la función plaquetaria, siendo por ejemplo la PGI<sub>2</sub>, sintetizada a nivel del endotelio vascular, uno de los inhibidores más potentes de la agregación plaquetaria. Además producen el efecto vasodilatador ya previamente comentado (108,111,112).



- Sobre la respuesta inmunitaria ejercen una acción reguladora con inhibición de la proliferación y función de los linfocitos (108).

- Su acción sobre la función renal se ejerce en la médula renal con modulación del tono vascular y de la homeostasis del sodio y agua a través de la regulación de la hemodinámica glomerular, la reabsorción tubular y de la secreción de renina (108,111,112).

- Sobre el tracto gastrointestinal sus acciones más conocidas son a nivel gástrico con aumento del flujo sanguíneo, de la producción de moco y bicarbonato y efectos protectores frente a agentes lesivos sobre la mucosa. En el intestino tienen un papel en la regulación de la motilidad gastrointestinal y de la secreción (110,113).

- Además ejercen otras acciones importantes en el árbol bronquial, en el metabolismo óseo, en órganos endocrinos, y en el sistema reproductor masculino y femenino (108,110-112).

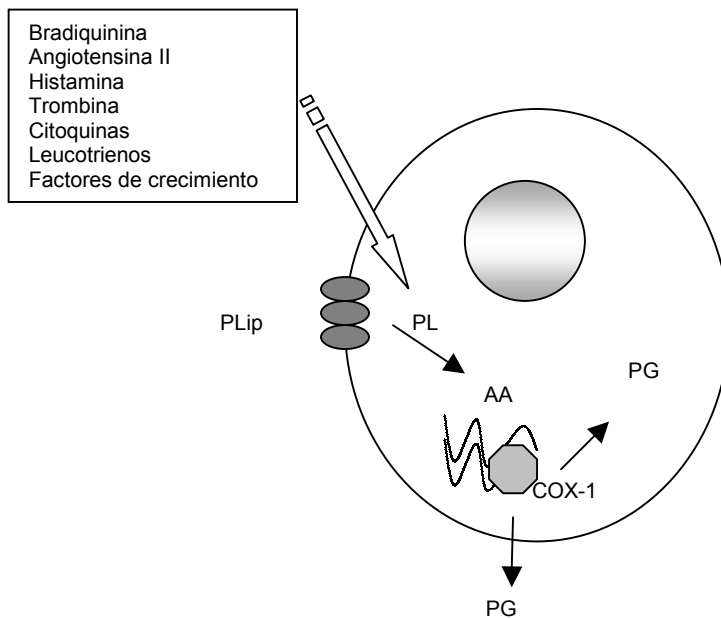
### 3.3.- ISOFORMAS DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA

En 1989 se identificó una segunda isoforma de la enzima COX con una estructura muy similar pero con una diferencia sustancial en cuanto al patrón de expresión y su biología (114). La razón para la existencia de dos isoenzimas de la COX es todavía desconocida.

La isoforma COX-1 se expresa de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos, lo que se sugiere que su función principal es la producción de PG para la regulación homeostática. En cambio la isoforma COX-2 es inducible y en condiciones basales sus niveles son prácticamente indetectables. Pero como respuesta a diferentes estímulos como el lipopolisacárido (LPS), interleuquina 1 (IL-1),  $TNF\alpha$ , endotoxina y estrés oxidativo entre otros, se produce un aumento de su expresión y de la producción de PG y TXA (figura 2) (109,110,115,116).

Estudios más recientes han hallado tejidos como el cerebro, la mácula densa renal y la placenta que expresan COX-2 de forma constitutiva, y por tanto, también juega un papel importante en procesos fisiológicos normales (112,117).

Célula en condiciones normales



Célula en condiciones patológicas

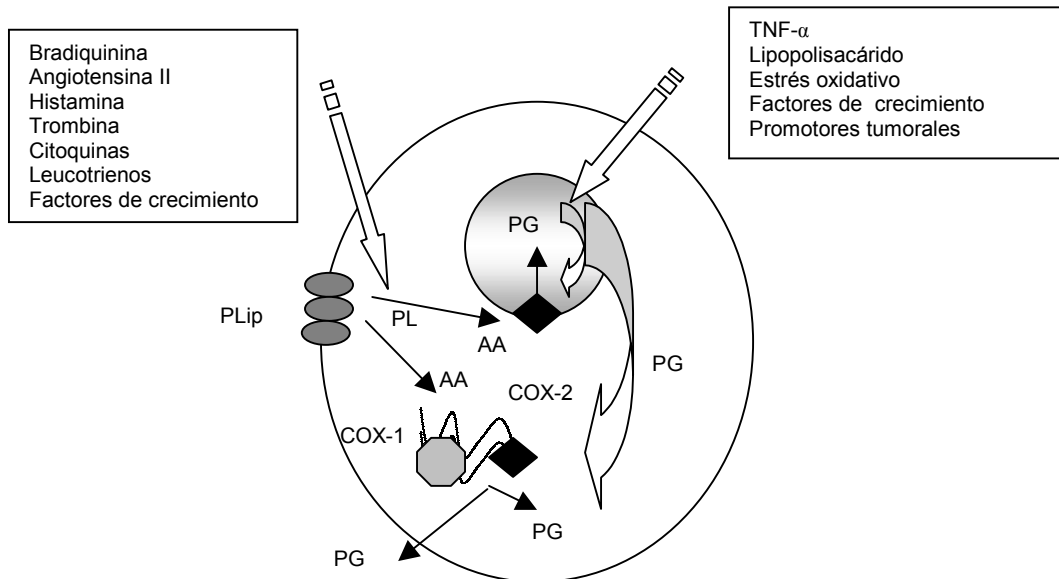


Figura 2

La COX-1 es una enzima constitutiva que produce eicosanoides con acción para o autocrina para la regulación homeostática de la célula en condiciones normales. En cambio, ante determinados estímulos patológicos se induce la expresión de novo de COX-2 que produciría eicosanoides tanto desde su localización en el retículo endoplásmico, como desde la membrana perinuclear. (PLip: Fosfolípidos de la membrana celular; PL: Fosfolipasas)

#### 4.- CICLOOXIGENASA 2 (COX-2)

##### 4.1.- ESTRUCTURA GENÓMICA Y MOLECULAR

El gen de la COX-2 está compuesto de 10 exones con un tamaño de 8,3 kilobases y localizado en el cromosoma 1 (1q25.2-25.3), frente al de la COX-1 que se encuentra en el cromosoma 9 (109).

El promotor del gen de la COX-2 contiene una caja TATA y sitios de unión para diferentes factores de transcripción, como el NF- $\kappa$ B o el factor nuclear para la expresión de interleuquina 6 (NF-IL-6), que están implicados en la inducción de COX-2 en respuesta a diversos estímulos (109,112,117).

La estructura tridimensional obtenida mediante cristalografía por rayos X es idéntica entre ambas isoformas de la COX, al igual que su actividad catalítica y su inhibición por parte de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). La COX-2 tiene un peso molecular de 71 kD y está formada por unos 600 aminoácidos, compartiendo un 63% de su secuencia con la COX-1. Los residuos del canal de unión con el ligando, los sitios catalíticos y los residuos inmediatamente próximos son idénticos salvo por dos posiciones (Ile por Val en posiciones 434 y 523) (111,112). También existen diferencias en sus terminaciones NH<sub>2</sub> y COOH (109).

#### 4.2.- LOCALIZACIÓN CELULAR

Mientras que la COX-1 se localiza predominantemente en el retículo endoplásmico, la COX-2 se encuentra tanto a nivel perinuclear, en la superficie interna de la membrana nuclear, como en el retículo endoplásmico, por lo que los eicosanoides producidos se distribuirán preferentemente por el núcleo, a diferencia de las PG producidas por la COX-1, y por tanto ejercerán acciones moduladoras sobre la transcripción de genes diana (109).

#### 4.3.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN

La COX-2, como hemos comentado previamente, no se expresa en la mayor parte de los tejidos de mamíferos, pero ésta se induce rápidamente por la acción de factores de crecimiento, promotores tumorales, hormonas, endotoxina bacteriana y diversas citoquinas. La regulación de su expresión se produce por diferentes vías, tanto a nivel transcripcional (caja TATA) como post-transcripcional sobre el ARNm (112,117).

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que se encuentra en múltiples tipos celulares y regula un amplio número de genes relacionados con la respuesta inmune y la inflamación. En la célula en reposo se localiza en el citoplasma celular y ante estímulos apropiados, se libera de las proteínas inhibitorias I $\kappa$ B, entra en el núcleo y se une a determinadas secuencias de ADN en numerosos promotores, activando la transcripción de dichos genes (118). Existen evidencias experimentales del papel del NF- $\kappa$ B en la expresión de la COX-2. La

utilización de inhibidores del NF- $\kappa$ B producía, en macrófagos en cultivo, una reducción concentración dependiente de la expresión de la COX-2 y de la producción de PG (118,119). En otro estudio con células trofoblásticas de rata en cultivo, la expresión del gen de la COX-2 dependía de la activación del NF- $\kappa$ B (120). Todo esto sugiere que la activación del NF- $\kappa$ B es una vía importante de inducción de la expresión génica de la COX-2.

#### 4.4.- ACCIONES BIOLÓGICAS

Derivado de lo anteriormente expuesto, existen autores que sugieren que la COX-1 y la COX-2 son sistemas de síntesis de PG parcialmente independientes. La COX-1 produce prostanoïdes con acción extracelular para o autocrina para la regulación de la homeostasis del medio, mientras que la COX-2 tendría dos funciones, la primera en relación con su localización en el retículo endoplásmico para aumentar la función de la COX-1, y la COX-2 localizada en la superficie interna de la membrana nuclear como un sistema de producción de PG con acción nuclear en la replicación y diferenciación celular (figura 2) (117).

## 5.- CICLOOXIGENASA 2 E HÍGADO

### 5.1.- EXPRESIÓN DE LA COX-2 POR LOS HEPATOCITOS

Johnston y Kroening demostraron que los hepatocitos de rata, incluso ante estímulos apropiados, no expresaban COX-2 a diferencia de otras células intrahepáticas como las células de Kupffer y las CE (121). Sin embargo los hepatocitos fetales de rata sí expresan la COX-2, perdiendo esta facultad con su diferenciación a hepatocitos adultos. El mecanismo de supresión de la inducción de la expresión de la COX-2 en hepatocitos adultos de rata depende de factores de transcripción de la familia de los C/EBP que actuarían a nivel del promotor del gen de la COX-2 (122). Se desprende de este hallazgo que la expresión de la COX-2 por los hepatocitos adultos puede ser un marcador de desdiferenciación celular.

### 5.2.- FUNCIONALIDAD DE LA COX-2 A NIVEL HEPÁTICO

En el hígado las PG se han involucrado en la regeneración hepática al estimular la proliferación de los hepatocitos (123). Los factores de crecimiento de hepatocitos (HGF) y epidérmico (EGF) provocan la activación de la PLA<sub>2</sub> y la liberación del AA, con la producción de PG que actuarían como mediadores autocrinos y provocarían el aumento de síntesis de ADN (124).

También existen evidencias de su implicación en la remodelación tisular hepática y por tanto en la fibrogénesis. En cultivos de hepatocitos de rata se

demuestra la síntesis y liberación a la MEC de MMP-2 y MMP-9 en respuesta a la PGE<sub>2</sub> añadida al medio de cultivo, siendo ésta paralela al nivel de expresión de la COX-2 (125).

En la patogenia de la hipertensión portal, mediante estudios de modelos animales, se ha implicado a las PG, fundamentalmente la PGI<sub>2</sub>, en la vasodilatación e hiperemia esplácnica (126-129). Otros estudios más recientes han puesto de manifiesto que la producción de TXA<sub>2</sub>, derivado de la COX-2, juega un papel fundamental en el aumento de la resistencia vascular a nivel sinusoidal (130,131), aunque el papel patogénico de las PG, en la hipertensión portal sinusoidal, aún no está establecido (132).

### 5.3.- EXPRESIÓN DE LA COX-2 EN LAS HEPATOPATÍAS CRÓNICAS

#### 5.3.1.- Hepatopatía alcohólica

En la patogenia de la lesión hepática por alcohol juegan un papel predominante las células de Kupffer, en respuesta al estrés oxidativo y al aumento de la endotoxina. La activación del NF-κB por la endotoxina o por radicales libres produce una intensa expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF $\alpha$ , y de la COX-2, fundamentalmente en las células de Kupffer (133). En modelos de enfermedad alcohólica en ratas se ha demostrado que el aumento de expresión de la COX-2 está asociado a la intensidad de la lesión necroinflamatoria y al aumento de endotoxina, del TNF $\alpha$  y de la peroxidación lipídica (134,135).



### 5.3.2.- Hepatopatía vírica

Los mecanismos patogénicos de la lesión hepática por virus no están bien definidos. En estudios recientes se están generando evidencias, cada vez más sólidas, de la participación de la COX-2 en los mismos.

En relación con el objetivo de evaluar la expresión de la COX-2 y su implicación en HC víricas, se han publicado dos artículos recientemente. En el primero de ellos Cheng y cols (136), observaron un aumento de la expresión hepatocelular de la COX-2 en muestras de biopsias hepáticas de pacientes con HC por el VHB. Curiosamente, no encontraron relación entre el grado de expresión de la COX-2 y el índice de actividad histológica, ni con las concentraciones séricas de ADN del VHB ni de las transaminasas. En los pacientes con respuesta histológica favorable tras tratamiento antivírico no observaron cambios en la expresión de la COX-2. En el otro estudio (137) se demostró la expresión citoplasmática de la COX-2 en hepatocitos de pacientes con HC víricas, por inmunohistoquímica, aumentando su intensidad y extensión en relación con la progresión de la fibrosis, y sin relación con la actividad inflamatoria. En relación con parámetros clínicos, los autores encontraron correlación con las transaminasas, plaquetas, albúmina y gammaglobulinas. También determinaron una relación entre las concentraciones séricas de ácido hialurónico, la progresión de la fibrosis y la expresión de la COX-2. Todo esto sugiere la existencia de una relación entre la expresión de la COX-2 y la fibrogénesis hepática.

Por otro lado, a pesar de los resultados contradictorios obtenidos en diferentes ensayos clínicos en pacientes con hepatitis crónica vírica (138,139), se ha sugerido el posible efecto potenciador de la inhibición de la COX-2, mediante antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), sobre la actividad antivírica del interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (140,141). En este sentido, un estudio experimental demostró que el efecto sinérgico antivírico de la indometacina con el IFN- $\alpha$  estaría en relación con la activación de vías de señalización intracelular que convergen en la activación de las proteínas STATs, que potenciarían la activación de genes dependientes de la acción del IFN- $\alpha$  (141). Por último, en un estudio con un número limitado de pacientes con HC por el VHB, que fueron tratados con indometacina, se observó una importante inhibición de la replicación vírica (142).

### 5.3.3.- Cirrosis hepática

Estudios en modelos animales de CH han aportado evidencias experimentales de que la inhibición de la COX puede prevenir el desarrollo de CH y de nódulos preneoplásicos (143,144). Recientemente Yamamoto y cols (145), han valorado si la inhibición selectiva de la COX-2 es suficiente para conseguir este objetivo. Los autores demuestran en ratas, a las que se les induce el desarrollo de CH mediante una dieta deficiente de colina, que un inhibidor específico de la COX-2, el JTE-522, inhibe de manera concentración dependiente la fibrosis hepática, y además previene la CH, el crecimiento de lesiones preneoplásicas y la aparición de CHC. Es importante remarcar que no

detectan toxicidad significativa de los inhibidores de COX-2 en este modelo. Los autores sugieren que los mecanismos por los que la inhibición de la COX-2 previene la fibrogénesis y la hepatocarcinogénesis en el modelo de rata serían la inhibición de la activación de las CE, la disminución de la expresión de c-myc, y la supresión de la proliferación celular y de la inflamación hepática.

#### 5.4.- EXPRESIÓN DE LA COX 2 Y HEPATOCARCINOMA

El estudio de la relación entre la COX-2 y la hepatocarcinogénesis ha derivado de la implicación de la COX-2 en la carcinogénesis en otros tejidos, principalmente en el cáncer de colon (146). La observación de esta asociación de la COX-2 y de las PG derivadas de su activación, PGE<sub>2</sub> fundamentalmente, en la iniciación, mantenimiento del crecimiento y supervivencia de las células tumorales se ha relacionado con la inducción de la neoangiogénesis vía factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (147-149) y a la inhibición de la vía apoptótica y aumento de la adhesión a la MEC de las células que sobre-expresaban la COX-2 (150).

##### 5.4.1.- Implicación de la COX 2 en la hepatocarcinogénesis

Estudios experimentales han valorado los mecanismos carcinogénicos a nivel hepático relacionados con la COX-2. Como explicamos anteriormente, el NF-κB es un factor nuclear que regula a nivel transcripcional la expresión de la COX-2. Con cultivos de hepatocitos tumorales provenientes de pacientes con

infección por el VHC y mediante transfección de la proteína core del VHC a líneas celulares humanas de hepatoblastoma (células HepG2), Tai y cols, demostraron la activación del NFκB y su implicación en la resistencia a la apoptosis celular (151). El mecanismo a través del cual el NF-κB causa la resistencia a la apoptosis no queda aclarado pero si lo ponemos en relación con los hallazgos referidos anteriormente en otros tipos celulares (118,119), la implicación de la COX-2 no puede ser descartada. En otro estudio en líneas celulares humanas de hepatoma, se demostró cómo un inhibidor selectivo de la COX-2, el NS-398, producía una inhibición de la proliferación de las células que sobre-expresaban la COX-2 y una disminución de la producción de PGE<sub>2</sub>, debido en parte al aumento de la tasa de apoptosis (152). Esta relación entre la expresión de la COX-2 y la inhibición de la apoptosis con el consiguiente aumento de la proliferación celular, ha sido también demostrada en otros estudios mediante la supresión de la actividad de la COX-2 con sulindaco, nimesulida o NS-398 (153-156). Estos hallazgos representan una base racional para el uso de inhibidores de la COX-2 en la quimioprevención del CHC (157).

Por último existen estudios que relacionan la expresión de la COX-2 y el aumento de la capacidad de invasión celular por líneas celulares de hepatoma vía activación de MMPs por la PGE<sub>2</sub>, provocado por la proteína X del VHB (158). Otros estudios sugieren que la COX-2 sería un factor permisivo de la invasión celular tumoral pero no suficiente en sí mismo (159).

#### 5.4.2.- Expresión de la COX-2 en el CHC

El estudio de la expresión de la COX-2 en muestras de CHC procedentes de pacientes ha ido parejo al estudio de los mecanismos que implican a la COX-2 en la hepatocarcinogénesis, además de establecer la correlación in vivo de la sobre-expresión de la COX-2 en el CHC y sus posibles implicaciones terapéuticas.

En 1999 se publicaron 3 artículos que han servido de referencia en el estudio de la relación entre la expresión de la COX-2 y el desarrollo de CHC. En el primero de ellos, Koga y cols (160) evaluaron mediante inmunohistoquímica y Western Blot la expresión de la COX-2 en muestras de CHC resecado de 44 pacientes. Demostraron una intensa expresión de la COX-2 en el CHC bien diferenciado y una marcada disminución de su expresión en las células tumorales de los CHC moderada o pobremente diferenciados, por lo que concluyeron que la COX-2 tiene un papel en los estadios iniciales de hepatocarcinogénesis y en la dediferenciación de estas células. Estos autores también demostraron la expresión de la COX-2 en el citoplasma de las células hepáticas tumorales y no tumorales, en las células sinusoidales y en las células inflamatorias, con un aumento progresivo y significativo de la expresión de la COX-2 en el tejido peritumoral en relación con una mayor gravedad de la lesión hepática existente. Los otros dos estudios, publicados por Shiota y cols (161) y Kondo y cols (162), corroboraron estos hallazgos. Vale la pena remarcar que el último de estos estudios encontró una correlación significativa entre la presencia de inflamación en el tejido peritumoral y el grado de expresión de la

COX-2 en este tejido. La expresión aumentada de la COX-2 se hallaba relacionada con la presencia histológica de CH y por tanto a una menor supervivencia del paciente. Estudios más recientes o bien no aportan más datos, confirmando los previos (163), o plantean controversia debido a unos resultados contradictorios respecto a los estudios previos. Así, Morinaga y cols (164) investigaron la expresión de la COX-2 en tejido tumoral y peritumoral mediante inmunohistoquímica y determinación de ARNm por PCR cuantitativa. Los autores observaron una mayor expresión del ARNm de la COX-2 en el tejido no tumoral, no aportando datos sobre el grado de diferenciación de los CHC en estudio, así como que el grado de expresión no difería entre la HC y la CH. Además encontraron una correlación positiva entre los niveles de expresión de la COX-2 con el índice de actividad histológica, las concentraciones séricas de GPT y el índice Ki-67, indicador de la actividad regenerativa. Los autores concluyen que la COX-2 estaría más implicada en la patogénesis de la lesión hepática que en el desarrollo del CHC.

#### 5.5.- EXPRESIÓN DE COX 2 Y COLANGIOCARCINOMA

Recientes estudios sobre la expresión de la COX-2 en las células ductales del epitelio biliar han aportado nuevos conocimientos en la génesis del colangiocarcinoma (CC). Hayashi y cols (165) observaron, en muestras de CC, que las células ductales tumorales presentaban los mayores niveles de expresión de la COX-2, siendo esta menor en las células no tumorales ductales con reacción inflamatoria, y prácticamente inexistente en las células no

tumorales ductales sin inflamación asociada. Además encontraron una marcada expresión de la COX-2 en las células epiteliales del ducto biliar de pacientes con una colangitis esclerosante primaria. Los autores sugieren que la COX-2, inducida en la reacción inflamatoria, contribuye a la carcinogénesis en el CC.

El estudio, en líneas celulares de CC, de la implicación de la COX-2 en la patogenia del CC ha mostrado: la inducción de la COX-2 vía activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico por los ácidos biliares (166), la inhibición de la apoptosis por la COX-2 (167), la implicación de las PG en la proliferación de las células tumorales (168) y ha puesto de manifiesto como la inhibición de la COX-2 se asocia a una supresión del crecimiento de las células tumorales (165,168). En muestras de CC se ha demostrado una correlación entre el incremento de la expresión de las proteínas ERBB-2 y COX-2 (169) y la implicación de la COX-2 a nivel de los eventos más tempranos de la carcinogénesis de los ductos biliares y su mayor expresión en los tumores más diferenciados (169,170). Todos estos hallazgos sugieren que la COX-2 puede ser una diana terapéutica en la quimioprevención del colangiocarcinoma (171,172).

# OBJETIVOS



## **1.- INTRODUCCIÓN**

La prevalencia de las hepatitis crónicas en la población general es elevada. De entre las causas que la producen una de las más importantes es la infección por el VHC. La evolución a CH y CHC no es despreciable en estos pacientes, como hemos expuesto previamente.

El tratamiento actual de la HC por VHC está limitado a un subgrupo de pacientes debido a los problemas de tolerancia y efectos adversos que presenta. La demostración de nuevas vías patogénicas, tanto de la fibrosis hepática como del CHC, permitiría el desarrollo de nuevas líneas terapéuticas.

Por tanto, la posible implicación de la COX-2 y sus metabolitos, las PG, en los mecanismos patogénicos de la fibrosis hepática y la hepatocarcinogénesis abriría una nueva posibilidad terapéutica, al disponer de inhibidores selectivos de esta enzima que han demostrado un nivel de toxicidad inferior a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) convencionales.

## **2.- HIPÓTESIS**

Los diferentes mecanismos patogénicos que producen la lesión hepática en la infección crónica por el VHC van a activar la expresión de COX-2 a nivel hepatocitario. Esta expresión aumentará de forma progresiva y paralela a la gravedad de la lesión hepática, siendo su máxima expresión en la CH, como expresión de su potencial fibrogénico y carcinogénico.

### 3.- OBJETIVOS

Para demostrar nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Estudiar el patrón de expresión de la enzima COX-2 en el tejido hepático de pacientes con infección crónica por el VHC, tanto de forma cuantitativa como de su localización tisular y celular.

2.- Valorar la expresión de la COX-2 en relación con la gravedad de la lesión hepática por la infección crónica por el VHC.

3.- Valorar si existen diferencias en la expresión hepatocelular de la COX-2 entre la infección crónica por el VHC y la lesión hepática producida por el consumo de alcohol.

4.- Determinar la posible relación entre el patrón de expresión de la COX-2 y la síntesis de MMPs en el tejido hepático de pacientes con HC por VHC.

5.- Analizar la posible asociación entre los niveles de expresión intrahepática de la COX-2 con las características clínicas, bioquímicas, virológicas e histológicas de los pacientes con infección crónica por el VHC.

# **PACIENTES Y MÉTODOS**

1.- PACIENTES

1.1.- SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

El estudio incluye a 51 pacientes, que se distribuyen según la etiología de la lesión hepática como se expresa en la tabla 3.

Tabla 3

Características de los pacientes según la lesión hepática y su etiología

VIRUS C	HEPATITIS CRÓNICA	27
	CIRROSIS	5
Alcohol	Esteatosis	3
	Cirrosis	6
Control	Esteatosis no alcohólica	6
	Hígado normal	4

Los criterios diagnósticos etiológicos son los expuestos a continuación:

. HC por el VHC: Presencia de anticuerpos frente al VHC (anti-VHC) y positividad para el ARN del VHC en el suero al menos 6 meses antes de la biopsia hepática o del trasplante hepático (TH). Se descartó la ingesta alcohólica y la toma de medicación hepatotóxica mediante anamnesis, la HC por

VHB por la negatividad del HBsAg en el suero y la infección VIH. Además no existieron alteraciones clínicas, analíticas o histológicas que hubieran sugerido otra enfermedad hepática concomitante.

. Hepatopatía alcohólica: El diagnóstico se basó en una historia clínica con datos de ingesta alcohólica significativa (>80 gr/día de etanol) y descartadas otras sustancias hepatotóxicas, en la negatividad para los marcadores séricos del VHC, VHB, y VIH, y en un estudio ecográfico e histológico compatibles.

. Grupo control: Esta conformado por dos grupos de pacientes. El primer grupo son pacientes con esteatosis hepática no alcohólica que presentaban en la biopsia hepática una actividad necroinflamatoria leve-moderada y sin fibrosis asociadas según la clasificación propuesta por Brunt y cols (173) expuesta en la tabla 4, sin datos en la historia clínica de ingesta etílica, y con un estudio completo negativo para otras causas de hepatopatía. El segundo grupo son pacientes con hígado histológicamente normal y con negatividad para el HBsAg y de las serologías del VHC y VIH.

Los datos personales de los pacientes participantes en esta investigación clínica fueron tratados con confidencialidad y seguridad según la normativa desarrollada al amparo de la Ley 15/99 (R.D. 994/99), referente al tratamiento de los ficheros de datos de carácter personal. El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación

Clínica de cada centro donde se ha realizado la recogida de muestras, con la finalidad de confirmar la cumplimentación correcta de las normas de buena práctica clínica y uso de muestras biológicas en estudios clínicos.

**Tabla 4**

Sistema de graduación y estadiaje histológico de la Enfermedad Hepática por Depósito de Grasa (no alcohólica) (EHDG).

<b>GRADO</b>	<p><b>ESTEATOSIS</b>                  Grado 0: No                  Grado 1: &lt;33%                  Grado 2: 33-66%                  Grado 3: &gt;66%</p> <p><b>ACTIVIDAD NECROINFLAMATORIA</b>  <i>Grado 1 (leve):</i> Esteatosis &lt;66%, algunos hepatocitos balonizados, escasos neutrófilos y linfocitos en área 3, inflamación portal mínima o inexistente.  <i>Grado 2 (moderada):</i> Esteatosis, abundantes hepatocitos balonizados y neutrófilos en zona 3, inflamación portal leve o moderada.  <i>Grado 3 (grave):</i> Esteatosis panlobulillar, degeneración balonizante e infiltración por neutrófilos difusas, infiltración portal leve o moderada.</p>
<b>ESTADIO</b>	<p><i>Estadio 0:</i> Sin fibrosis.  <i>Estadio 1:</i> Fibrosis perisinusoidal/pericelular en zona 3.  <i>Estadio 2:</i> Estadio 1 más fibrosis portal o periportal.  <i>Estadio 3:</i> Estadio 2 más puentes.  <i>Estadio 4:</i> Cirrosis.</p>

## 1.2.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

En la tabla 5 se expresan los datos clínicos y analíticos de los pacientes según la etiología de su hepatopatía.

**Tabla 5**  
Características clínicas y analíticas de los pacientes

	VHC (N=32)	ALCOHOL (N=9)
Edad (años)	44,8 ± 8,9	52,6 ± 9
Sexo V/M (%)	72 / 28	88,9 / 11,1
GOT (U/l)	54,6 ± 33,6	63,3 ± 29,7
GPT (U/l)	93,6 ± 49,1	48,7 ± 21
Bilirrubina total (mg/dl)	0,7 ± 0,6	3,4 ± 2,5
Albúmina (mg/dl)	4 ± 0,5	3,7 ± 0,6
INR	1,04 ± 0,2	1,44 ± 0,5

El grupo control está compuesto por 10 pacientes. Cuatro pacientes con hígado histológicamente normal que tenían una edad media de 43,4 ± 21,2 años, y de los cuales 3 eran mujeres y uno varón con niveles de GOT y GPT de 17 ± 9,9 y 34,7 ± 25,5 (U/l), respectivamente; y 6 pacientes, 5 varones, con esteatosis hepática no alcohólica con una edad media de 38,7 ± 15,7 años, que presentaban unos valores de GOT y GPT de 51,3 ± 16,7 y 122,2 ± 40,5 (U/l), respectivamente.

## 2.- ESTUDIO DE LAS MUESTRAS HEPÁTICAS

### 2.1.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de tejido hepático de HC vírica, hepatopatía alcohólica y EHDG se obtuvieron a partir de biopsias hepáticas realizadas mediante aguja de Menghini (Hepafix<sup>®</sup>, Braun, Germany) bajo control ecográfico, previo consentimiento informado por escrito, con fines diagnósticos o pronósticos basados en la práctica clínica habitual hospitalaria.

Las muestras de CH fueron obtenidas a partir de cuñas del hígado explantado durante la realización del TH, en la primera hora inmediatamente después de realizar la hepatectomía, previo consentimiento informado por escrito.

Las muestras de hígado histológicamente normal se obtuvieron de pacientes que se sometieron a cirugía por colelitiasis o resección de quistes hidatídicos, previo específico consentimiento informado por escrito.

Una vez obtenida la muestra de tejido hepático se dividió en dos partes, la primera se utilizó para el estudio histológico, por lo que se fijó en formaldehído al 10% y posteriormente se incluyó en parafina, y la segunda parte que se congeló rápidamente mediante nitrógeno líquido y se conservó a -80°C para el



posterior análisis por inmunohistoquímica, aislamiento de proteínas, de ARNm y/o medición de PG.

## 2.2.- HISTOLOGÍA: VALORACIÓN Y CLASIFICACIÓN

Las muestras de biopsia hepática fueron valoradas por dos patólogos diferentes, según los criterios diagnósticos anatomopatológicos convencionales.

En el caso de lesión hepática de etiología vírica se utilizó la clasificación propuesta por Scheuer (Tabla 2) (74) que puntúa de 0 a 4 el grado necroinflamatorio y el estadio de fibrosis, respectivamente. Posteriormente, se clasificó la actividad histológica de la HC por el VHC como leve o grave según la suma de ambos índices fuera igual o menor, o mayor a 4 puntos, respectivamente. De esta forma de los 27 pacientes con HC por el VHC, 22 presentaban una hepatitis crónica leve (HCL) y 5 grave (HCG).

En los pacientes con esteatosis hepática alcohólica, el diagnóstico anatomopatológico se realizó siguiendo los criterios habituales (174). Y para la EHDG se utilizó la clasificación de Brunt y cols (tabla 4) (173).

El diagnóstico de los pacientes con CH se realizó macroscópicamente y mediante análisis histológico de la pieza de hepatectomía. El número de pacientes con CH según la etiología se expresa en la tabla 3.

## 2.3.- ESTUDIOS CON MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO

### 2.3.1.- Expresión enzimática: Western Blot

Una parte de las muestras de tejido hepático de los 32 pacientes con HC por el VHC (22 HCL, 5 HCG, y 5 CH), de los 6 pacientes con CH por alcohol y de los 10 pacientes que conforman el grupo control se homogenizaron en un medio que contenía: MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L, EGTA 1 mmol, glicerol al 10%, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato al 0,5%, β-mercaptoetanol 1 mmol/L, PMSF 0,1 mmol/L, Tris 10 mmol/L y llevado a pH 7,5 con ácido clorhídrico. Los extractos se mezclaron en un vortex durante 30 minutos a 4°C y después centrifugados a 13000 g durante 20 minutos, obteniendo un sobrenadante que se almacenó a -20°C. Posteriormente las muestras se hirvieron en un buffer de Laemmli y cantidades similares de proteína (20 a 30 µg) se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10-12%. Los geles se transfirieron a una membrana de PDVF (Amersham®) y tras ser bloqueados con leche deshidratada desnatada al 5%, se incubaron con los anticuerpos específicos: anti-COX-2, anti-MMP-2, anti-MMP-9 (Cayman Chemical®), anti-Actina (Sigma®) al 1:1000. Se revelaron con un ECL™-kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham®).

Se llevaron a cabo diferentes tiempos de exposición para asegurar la linealidad de las intensidades de las bandas. Las bandas fueron controladas mediante la medición de β-actina. De las bandas obtenidas se realizó un

análisis densitométrico, utilizando un scanner (Amersham<sup>®</sup>), y el resultado se expresó en unidades arbitrarias.

### 2.3.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ARN total de las muestras de tejido hepático de 12 pacientes con HC por el VHC (4 HCL, 4 HCG, y 4 CH) y de 4 pacientes del grupo control (1 esteatosis no alcohólica y 3 muestras de hígado normal) se extrajo por el método de isotiocianato de guanidina utilizando el reactivo TRIzol (175). Sobre 1 µg de ARN se realizó una transcripción inversa utilizando la secuencia oligo (dT)<sub>16</sub> como cebador y 50 U de la transcriptasa inversa expandida (Roche<sup>®</sup>). La amplificación por PCR del ARN transcrito se llevo a cabo con 1 U de ADN polimerasa (Biotools<sup>®</sup>) en 50 µl de una mezcla reactiva que contenía 200 µM de cada dNTPs, 0,3 µM de cebadores específicos y un buffer reactivo al 1 x utilizando un ciclador térmico de ADN (Perkin-Elmer-Cetus<sup>®</sup>). Las condiciones de ciclado fueron de 3 minutos a 94°C; 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, y una elongación final de 5 minutos a 72°C. Los fragmentos de ADN amplificado se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. La cuantificación de las bandas se realizó por densitometría láser con un control de ARN ribosomal de 18S.

Las secuencias de oligonucleotidos se diseñaron en base a las secuencias publicadas (116). Los cebadores específicos de la COX-2 fueron 5'-CAGAGTTGGAAGCACTCTATGG-3' (sentido) y 5'-CTGTTTTAATGAGCTCTGGATC-

3' (antisentido) y proporcionó un producto de PCR específico de 303 pb. Los cebadores específicos de la MMP-9 fueron 5'-CCAGCATCTGTATGGTCGTG-3' (sentido) y 5'-CAGAAGGACCAGCAGTACCC-3' (antisentido) con un producto de PCR de 179 pb. Los cebadores para el ARN ribosomal de 18 S fueron 5'-GCAATTATTCCCCATGAACGA-3' (sentido) y 5'-CAAAGGGCAGGGACTTAATCAA-3' (antisentido) con un producto de PCR de 100 pb. La especificidad de las bandas amplificadas fue validada por el tamaño esperado de la banda. Además, el producto de la PCR se secuenció (Amersham®) y fue idéntico al predecible para la COX-2 humana (116).

### 2.3.3.- Actividad enzimática

Las concentraciones de PGE<sub>2</sub> se determinaron en homogenados de biopsias hepáticas, realizados en un buffer de ensayo (0,1 mol/L de fosfato a pH 7,5 que contenía 0,9% de albúmina sérica bovina), de 9 pacientes con HC por el VHC (3 HCL, 3 HCG, 3 CH) y de 6 pacientes control (3 esteatosis no alcohólica y 3 hígado normal). Tras ser tratados los homogenados con solución 1:4 de agua/etanol y 10 µl de ácido acético glacial, las muestras fueron purificadas en una minicolumna Amprep C18, eluido con acetato etílico y evaporadas hasta su secado bajo nitrógeno. Entonces los niveles de PGE<sub>2</sub> fueron determinados mediante un enzimo-inmunoanálisis (ELISA) según las indicaciones del fabricante (Amersham®).

La actividad de la MMP-9 se detectó en las mismas biopsias hepáticas que fueron homogenizadas en 50 mmol/L de Tris-HCl pH 7,4 con 1 mmol/L de glicerol. Tras centrifugar 10 minutos a 5000 g, el sobrenadante fue usado en un sistema de ensayo basado en un substrato cromogénico peptídico específico (Amersham®). Los niveles de proteína fueron determinados mediante la reacción Bradford.

#### 2.3.4.- Inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico se realizó en criosecciones de biopsia hepática de 12 pacientes con HC por el VHC (4 HCL, 4 HCG, y 4 CH), de 9 pacientes con hepatopatía alcohólica (3 esteatosis y 6 CH) y de 7 pacientes control (4 esteatosis no alcohólica y 3 pacientes con hígado normal).

##### 2.3.4.1.- Tinción por inmunoperoxidasa

El estudio inmunohistoquímico se efectuó por una técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Para ello se realizaron cortes de 4 micras de espesor en un criostato, que se fijaron en acetona durante 15 minutos y, posteriormente, los portas se almacenaron en papel de estaño a -20°C hasta la realización de la técnica.

Para la realización del estudio se utilizaron anticuerpos policlonales anti-COX-2 (Cayman Chemical®). Las muestras se incubaron en cámaras húmedas

con el anticuerpo a una dilución de 1:300 durante 2 horas. Tras finalizar la incubación se procedió a realizar dos lavados rápidos en buffer-tris salino ph 7,6 (TBS). Posteriormente, las secciones tisulares se incubaron con un antisuero de conejo anti-ratón (Dakopatts®) a una dilución de 1:300. Al finalizar esta incubación se realizaron dos nuevos lavados rápidos. El siguiente paso fue revelar las secciones del tejido hepático con el medio de Graham-Karnovsky, constituido por 0,5 mg/ml de 3,3'-tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (Sigma®) y peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo a los 5 minutos mediante lavado con TBS. Se realizó una contratinción de los cortes histológicos con hematoxilina de Carazzi, procediéndose a su deshidratación posterior al sumergirlos en una batería de alcoholes (alcohol 70°, alcohol 90°, alcohol absoluto, xilol), y por último se montaron en medio DPX según la técnica de rutina.

#### 2.3.4.2.- Valoración semicuantitativa

El análisis de las secciones teñidas por inmunoperoxidasa fue realizada mediante un microscopio óptico Nikon (Nikon Eclipse 400), a 250 aumentos, por tres observadores independientes sin conocimiento del diagnóstico clínico e histológico del paciente del que procedía la muestra. Cualquier hepatocito, célula epitelial biliar, célula endotelial sinusoidal o célula mononuclear fue considerada positiva en el análisis por los observadores si presentaba tinción marrón. De cara a establecer un análisis de los datos más preciso, cada

observador de forma aleatoria evaluó en cada sección 3 áreas portales, periportales y lobulillares.

La valoración semicuantitativa de cada área en las secciones se realizó de la siguiente forma: 0, no tinción; +1, tinción positiva en menos del 30% de las células en un campo de gran aumento; +2, tinción positiva en más del 30%, pero en menos del 70% de las células por campo de gran aumento; y +3 tinción positiva en más del 70% de las células por campo de gran aumento, habiendo sido este sistema de puntuación previamente validado (176). Cada muestra de biopsia obtuvo una cifra numérica como valor medio de todos los valores obtenidos de cara a su análisis estadístico.

### 3.- OTRAS DETERMINACIONES

Todas las determinaciones, tanto analíticas como serológicas y víricas, se realizaron antes de la obtención de la muestra histológica.

#### 3.1.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Las determinaciones bioquímicas habituales (bilirrubina total, GOT, GPT, albúmina e INR) se realizaron en un autoanalizador multicanal (Hitachi modular, Roche®).

#### 3.2.- DETERMINACIONES SEROLÓGICAS Y VÍRICAS

El HBsAg y el anticuerpo anti-VIH se analizaron mediante kits comerciales de ELISA habituales (Abbott®).

El anticuerpo anti-VHC se detectó con un kit comercial ELISA de segunda generación (Ortho®). El ARN del VHC se determinó mediante una técnica de transcriptasa inversa-PCR utilizando cebadores de la región constante del extremo 5' no codificante del genoma vírico (177) (Cobas Amplicor 1.5®, Roche). El genotipo del VHC se determinó de acuerdo con la técnica de Okamoto, usando transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR) con cebadores específicos del genoma viral (PCR/tiraje de VHC Inn-Lipa, Autolipa®, Bayer).



## 4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 4.1.- ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Las variables categóricas cualitativas se describen según su frecuencia relativa (%). Las variables cuantitativas se expresan como media  $\pm$  desviación típica, salvo la puntuación semicuantitativa de la expresión inmunohistoquímica de la COX-2 que se expresa mediante su mediana y rango.

### 4.2.- ESTADÍSTICA ANALÍTICA

Para el estudio estadístico de las variables cualitativas se realizó el test exacto de Fisher. El análisis de los niveles de la proteína de la COX-2, de la MMP-2 y MMP-9 se llevó a cabo mediante el test de la "t" de student. Para el análisis de los datos semicuantitativos del análisis inmunohistoquímico, ARNm de la COX-2, concentración de PGE<sub>2</sub> y actividad de la MMP-9 se utilizó el test de la "U" de Mann-Whitney. Para estudiar la correlación entre variables cuantitativas y el nivel de expresión intrahepática de la COX-2 se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, dado el ajuste a una distribución normal de los valores analizados. Un valor de p inferior a 0,05 nos permitió considerar las diferencias obtenidas como estadísticamente significativas.

El análisis estadístico ha sido llevado a cabo de forma informatizada con la versión 10.0 del programa SPSS<sup>®</sup>.

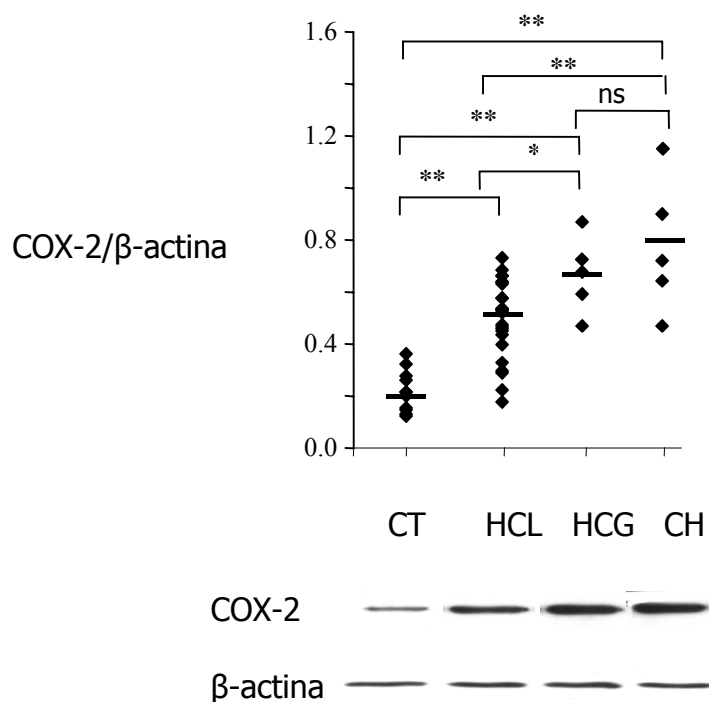
# RESULTADOS

## 1.- EXPRESIÓN INTRAHEPÁTICA DE LA COX-2 EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VHC

### 1.1.- VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA COX-2

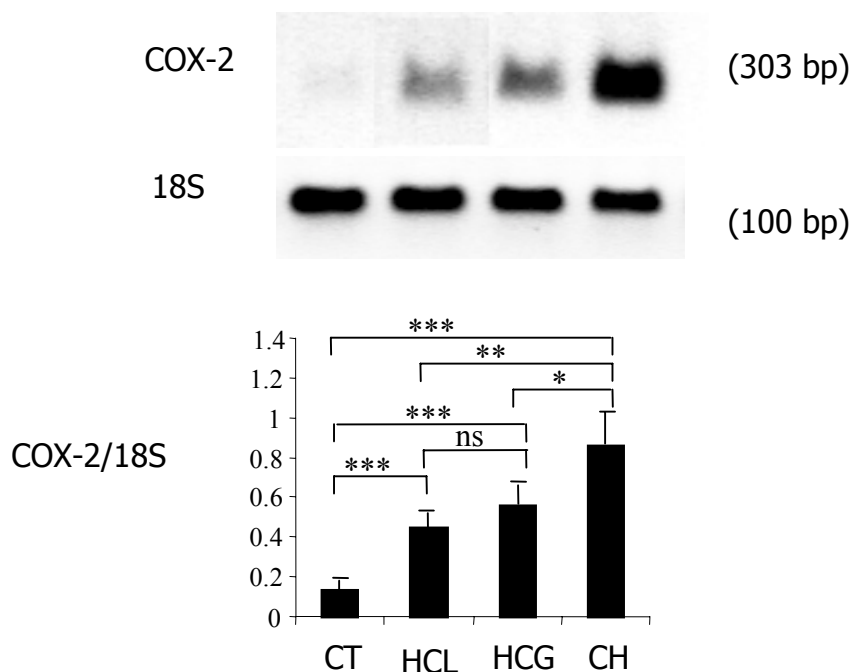
La cuantificación de los niveles de la proteína COX-2 en muestras de biopsia hepática de pacientes con HC por el VHC, mediante Western Blot, demostró un aumento de la expresión de 2,4 veces en la HCL, 3,3 veces en la HCG y 3,9 veces en la CH, respectivamente, respecto al valor en las muestras de pacientes del grupo control. Estas diferencias alcanzaron significación estadística (figura 3).

Para confirmar el aumento de expresión de la COX-2 se realizó un análisis por RT-PCR de diferentes muestras representativas de cada grupo histológico de HC por el VHC y del grupo control, encontrando que los niveles del ARNm de la COX-2 estaban aumentados en la HCL, en la HCG y en la CH (2,6, 3,5 y 5,3 veces, respectivamente) en consonancia con los resultados obtenidos en el análisis de la proteína (figura 4).



**Figura 3**

Se muestran los valores relativos de la COX-2, en función de la β-actina, de cada paciente y según el grupo histológico. La línea horizontal expresa la media de los niveles de expresión de la COX-2 (71 KD) obtenidos en unidades arbitrarias (CT, HCL, HCG y CH:  $0,2 \pm 0,02$ ;  $0,56 \pm 0,08$ ;  $0,66 \pm 0,1$  y  $0,78 \pm 0,09$ ; respectivamente). Estos fueron más altos en todos los grupos con HC por el VHC y en la CH por el VHC respecto al grupo control (CT), siendo estas diferencias significativas desde el punto de vista estadístico ( $p < 0,001^{**}$ ). También se demostraron diferencias entre la HCG y la CH con la HCL ( $p = 0,02^*$  y  $p < 0,001^{**}$ , respectivamente), no existiendo diferencias significativas entre la CH y la HCG ( $p = 0,08$ ). En la parte inferior se muestra un experimento representativo de Western Blot.



**Figura 4**

Los niveles de expresión del ARNm de la COX-2, medidos en unidades arbitrarias, eran significativamente más altos en los pacientes con HC por el VHC (HCL y HCG:  $0,48 \pm 0,08$  y  $0,6 \pm 0,12$ , respectivamente) y con CH por el VHC ( $0,85 \pm 0,15$ ) que los del grupo control (CT:  $0,19 \pm 0,03$ ) ( $p < 0,001^{***}$ ), en consonancia con el patrón de expresión de la COX-2 a nivel de la proteína. También se encontraron diferencias en los niveles de expresión entre la CH con la HCL ( $p < 0,01^{**}$ ) y la HCG ( $p = 0,02^*$ ), no existiendo entre las dos formas de HC ( $p = 0,1$ ). Los resultados se expresan como media y desviación estándar. En la parte superior se muestran las bandas de un experimento representativo de RT-PCR.

## 1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA COX-2

Para confirmar la funcionalidad de la expresión de la COX-2 se midieron las concentraciones de PGE<sub>2</sub> en muestras representativas de HC por VHC, CH por VHC y del grupo control, detectándose un aumento de su concentración de 1,9 veces y de 3,3 veces, en la HCG y en la CH respectivamente, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (figura 5).

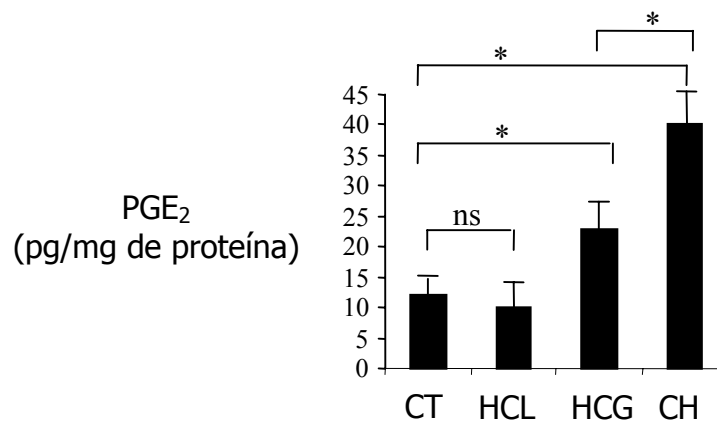


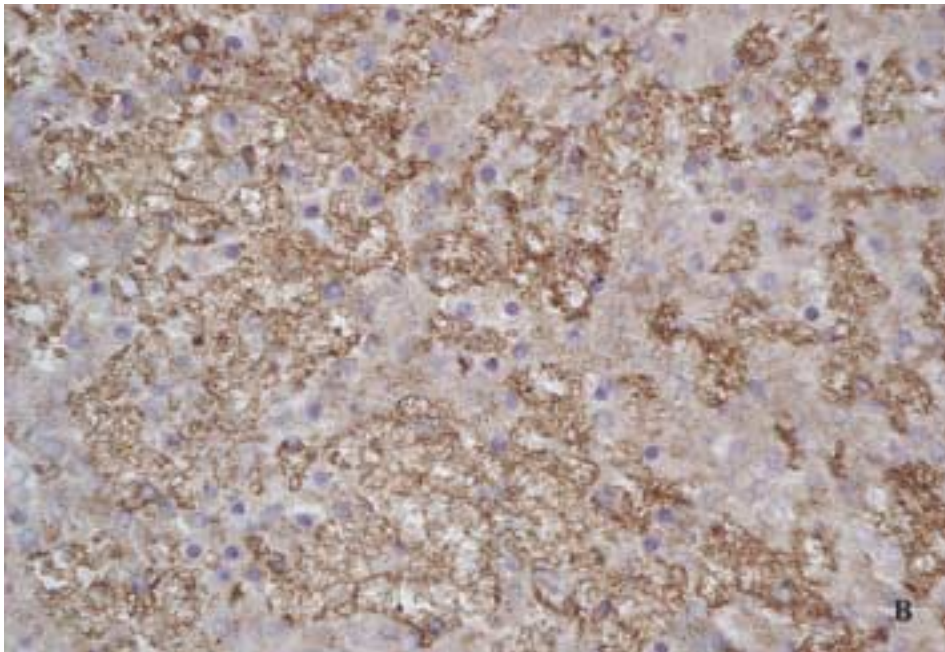
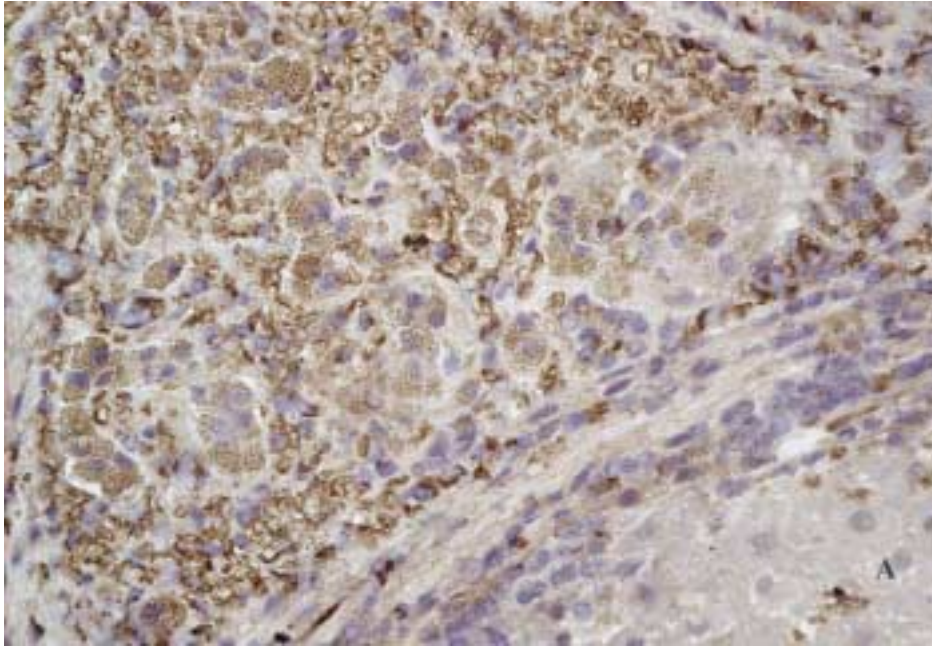
Figura 5

Las concentraciones de PGE<sub>2</sub> se analizaron por ELISA. Los resultados se presentan como su media y desviación estándar. Las diferencias en las concentraciones de PGE<sub>2</sub> entre el grupo control (CT: 12 ± 2 pg/mg) respecto a la HCG (23 ± 4 pg/mg) y la CH (40 ± 5 pg/mg) fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,001^*$ ), al igual que entre la HCG y la CH ( $p < 0,001^*$ ).

### 1.3.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Aunque el aumento de la expresión de la COX-2 estaba claramente establecido mediante los análisis de proteína por Western Blot y el análisis del ARNm de la COX-2 por RT-PCR, su localización tisular dentro del parénquima hepático estaba aún por definir. Por tanto, para resolver este punto, se realizó un estudio inmunohistoquímico de la enzima COX-2 en criosecciones de biopsia hepática de pacientes con HC y CH por el VHC. Para realizar un análisis comparativo, se llevaron a cabo experimentos de inmunohistoquímica en criosecciones de esteatosis y CH alcohólicas y del grupo control, tanto de hígado histológicamente normal como de esteatosis no alcohólica.

Como se muestra en los diferentes paneles de la figura 6, se observó un patrón de expresión diferente según el grupo histológico de infección crónica por el VHC. Así en pacientes con CH por VHC (figura 6, panel A), se observó inmunoreactividad en varios tipos celulares incluyendo células endoteliales portales, células del epitelio biliar, células endoteliales sinusoidales, células mononucleares y hepatocitos. Estos últimos muestran una tinción predominantemente citoplasmática, y aunque se observan hepatocitos positivos en el borde del lobulillo hepático, la mayoría de ellos estaban principalmente restringidos a los nódulos de regeneración. Es particularmente interesante la observación de un patrón de expresión similar en la CH alcohólica (figura 6, panel B).



**Figura 6 (Paneles A y B).**

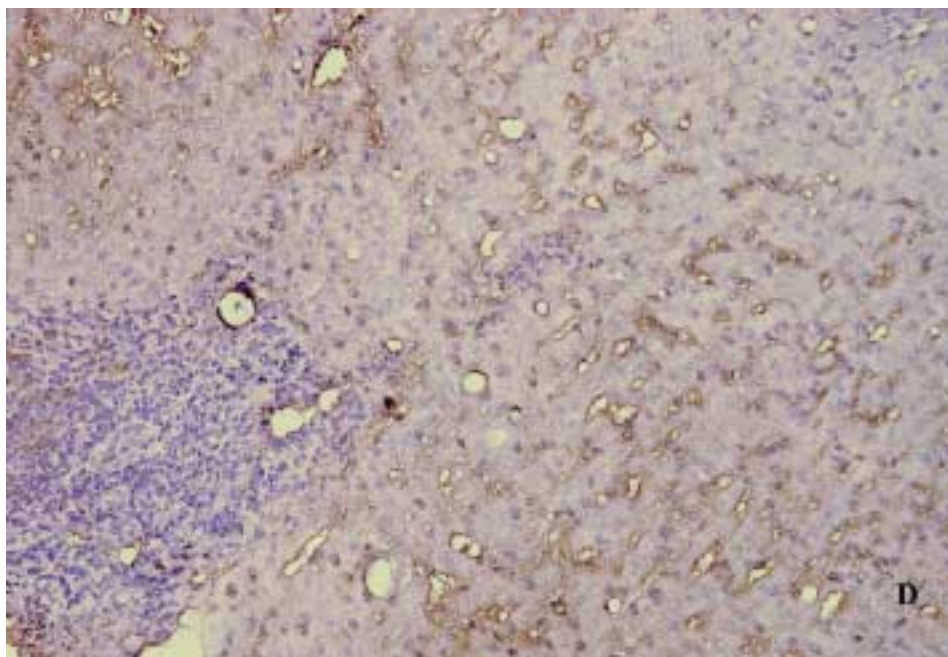
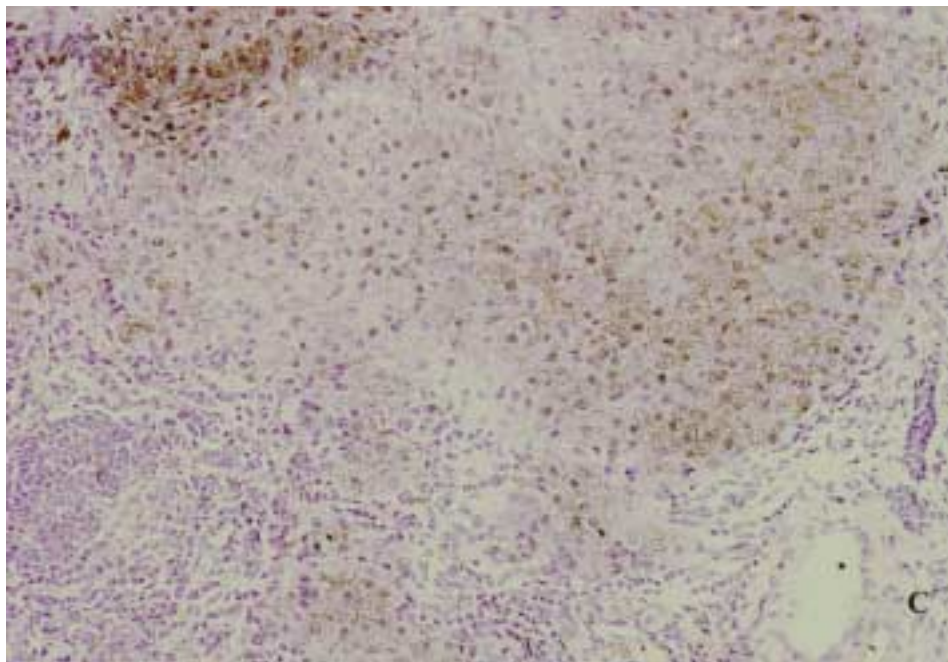
Secciones histológicas de CH por VHC (A) y alcohólica (B) con tinción inmunohistoquímica para la COX-2.



En contraste con el patrón de expresión descrito en la CH por el VHC, en los pacientes con HC por el VHC el patrón observado fue claramente diferente. Así, en las criosecciones de los pacientes con una HCG se observó inmunoreactividad para la COX-2 en hepatocitos localizados en algunas áreas periportales (figura 6, panel C), en células endoteliales sinusoidales y en células mononucleares. No se observó expresión en el endotelio portal ni en células del epitelio biliar. Es más, en los hepatocitos de pacientes con HCL no se observó tinción para la COX-2, siendo las únicas células positivas detectadas las del endotelio sinusoidal y las células mononucleares (figura 6, panel D), similar a la obtenida en la esteatosis alcohólica (dato no mostrado).

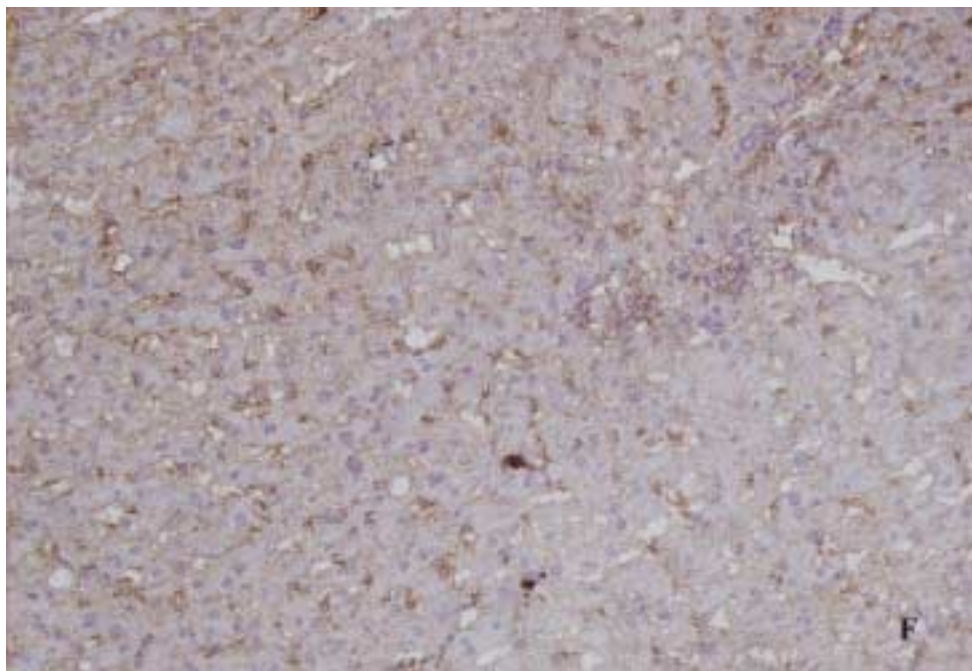
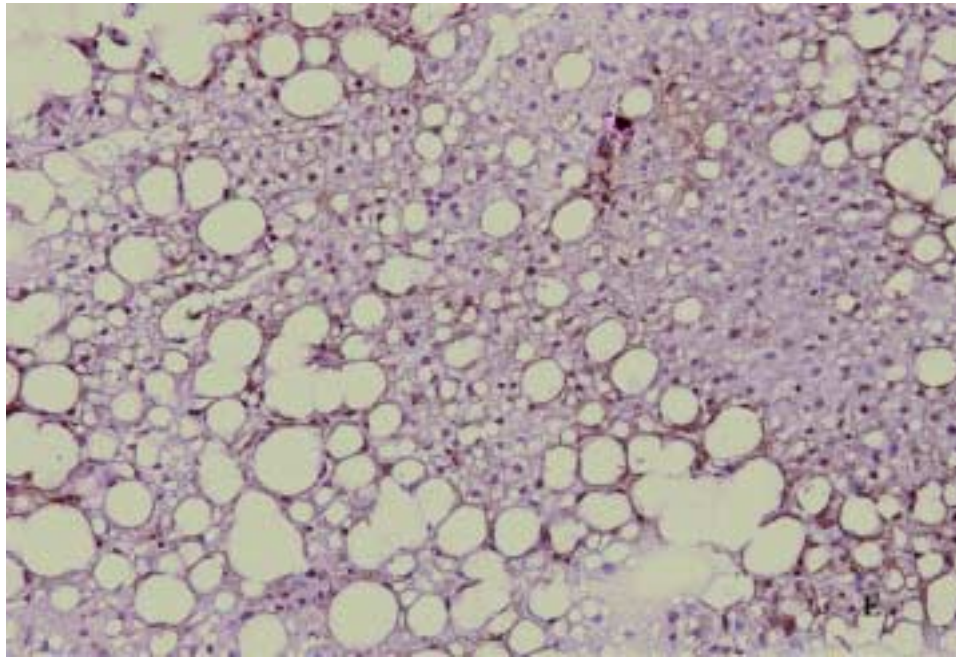
En las muestras de pacientes con esteatosis no alcohólica (figura 6, panel E) y con hígado histológicamente normal (figura 6, panel F) no se observó tinción inmunohistoquímica para la COX-2 en hepatocitos y solamente de forma dispersa en las células endoteliales sinusoidales.

Como controles negativos, se realizaron experimentos de inmunohistoquímica con un antisuero conejo anti-ratón, como anticuerpo primario, no detectándose inmunoreactividad en ningún tipo celular.



**Figura 6 (Paneles C y D).**

Secciones histológicas de HCG (C) y HCL (D) con tinción inmunohistoquímica para la COX-2.



**Figura 6 (Paneles E y F).**

Secciones histológicas de esteatosis no alcohólica (E) y de hígado histológicamente normal con tinción inmunohistoquímica para la COX-2.

## 2.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LA COX-2 ENTRE LA CIRROSIS HEPÁTICA POR EL VHC Y POR ALCOHOL

Con el fin de comprobar si la etiología de la CH pudiera influir en el patrón de expresión de la COX-2 se realizó el estudio de la expresión de la proteína por Western Blot y estudio inmunohistoquímico en muestras de tejido hepático de 6 pacientes con CH de origen alcohólico.

La cuantificación de los niveles de la proteína COX-2 en la CH alcohólica estaban aumentados respecto al grupo control de manera significativa ( $p < 0,001$ ). Esta expresión aumentada de la COX-2 en la CH alcohólica se comparó con la determinada en la CH por el VHC no demostrándose diferencias significativas ( $p = 0,08$ ) aunque se observan unos valores en unidades arbitrarias mayores para la CH por el VHC ( $0,78 \pm 0,09$  vs.  $0,45 \pm 0,14$ ).

Como se comentó en el apartado del estudio inmunohistoquímico el patrón de la expresión de la COX-2, en cuanto a su localización, fue similar en ambas etiologías para la CH. De cara a comprobarlo de manera más objetiva se realizó una comparación de la puntuación semicuantitativa de la tinción inmunohistoquímica de la COX-2 en criosecciones de pacientes con CH por VHC y alcohol. Como se muestra en la tabla 6, no se encontraron diferencias significativas en la puntuación de la tinción inmunohistoquímica entre ambos grupos.

**Tabla 6**  
**Puntuación semicuantitativa de la expresión inmunohistoquímica de la COX-2.**

Puntuación de la COX-2

---

CH por VHC (n=5)	2,6 (2-3)
CH alcohólica (n=6)	2,2 (2-3)

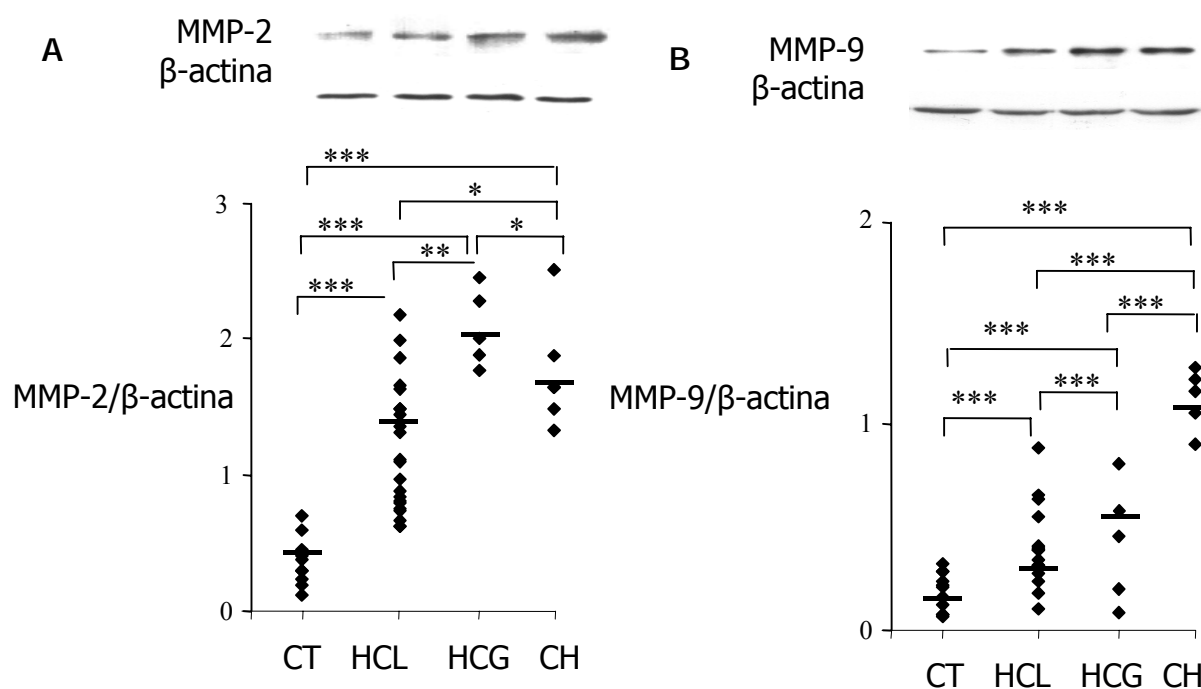
---

Los datos se expresan como la mediana de la intensidad y el rango entre paréntesis. Las diferencias entre ambos grupos etiológicos no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

### 3.- EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA MMP-2 Y LA MMP-9 EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VHC

Se ha descrito previamente la asociación entre la activación de las MMPs y la expresión de la COX-2 en hepatocitos de rata (125). Para investigar este aspecto en el tejido hepático humano se determinaron por Western Blot los niveles de la MMP-2 y la MMP-9 en muestras de pacientes con infección crónica por el VHC. En la figura 7 (Paneles A y B) se observa un aumento progresivo de la expresión de las proteínas MMP-2 y MMP-9 en la HCL (3,2 y 2 veces), en la HCG (4,7 y 2,6 veces) y en la CH (3,8 y 6,6 veces), respecto a los pacientes del grupo control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. El análisis mediante RT-PCR del ARNm de la MMP-9 demostró un incremento progresivo y paralelo al observado por Western Blot en la HCL, en la HCG y en la CH (figura 8, panel A). Además se midió la actividad de la MMP-9 en muestras representativas de biopsia hepática de pacientes con infección crónica por el VHC mediante un ensayo específico y se encontró un aumento de la actividad de la MMP-9 en la HCG (2 veces) y en la CH (2,8 veces) respecto al grupo control (figura 8, panel B).

Analizando de forma global los datos mostrados en las figuras 2 y 7, se observa una correlación positiva entre la expresión de la COX-2 y el nivel de MMP-2 y MMP-9 en todos los grupos de infección crónica por el VHC estudiados.



**Figura 7**

Análisis por Western Blot del nivel de expresión de la MMP-2 y MMP-9 en el tejido hepático de pacientes con infección crónica por el VHC. La línea horizontal expresa la media de los valores obtenidos. Las diferencias, medidas según unidades arbitrarias, de todos los grupos histológicos de infección crónica por el VHC (HCL, HCG y CH:  $1,44 \pm 0,1$ ;  $2,11 \pm 0,3$  y  $1,71 \pm 0,2$ ; respectivamente para MMP-2; y  $0,37 \pm 0,05$ ;  $0,47 \pm 0,06$  y  $1,18 \pm 0,13$  para MMP-9) respecto al grupo control (CT:  $0,45 \pm 0,03$  y  $0,18 \pm 0,02$ ; respectivamente para MMP-2 y MMP-9) fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ). En la parte superior de ambos paneles se muestra un experimento representativo de Western Blot.

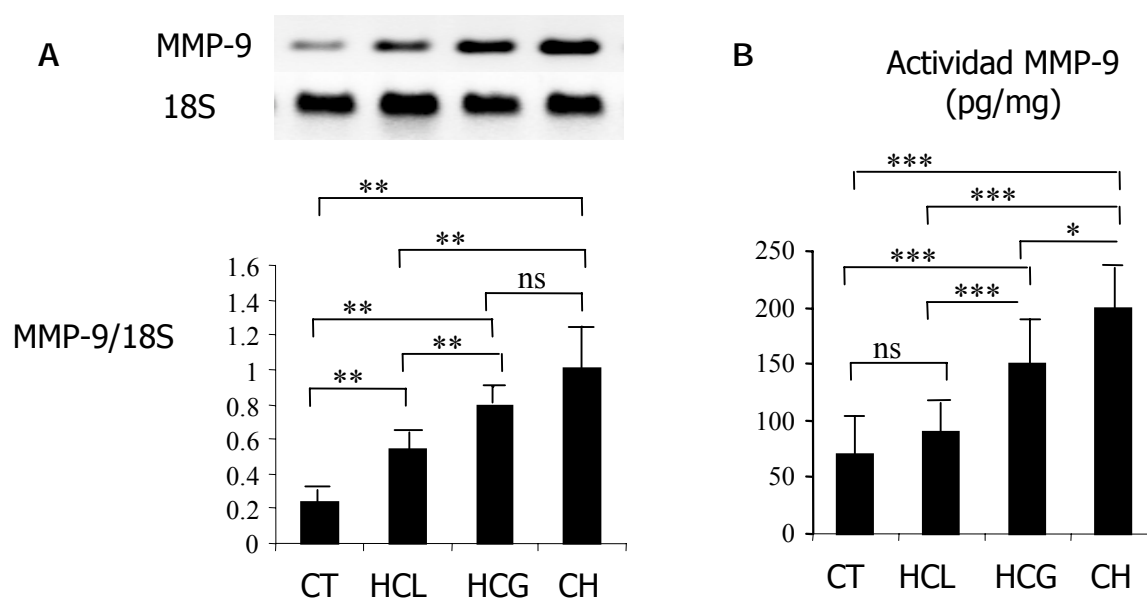


Figura 8

Análisis de los niveles del ARNm de MMP-9 mediante RT-PCR, mostrándose en su parte superior un experimento representativo (A). La actividad de MMP-9 fue determinada mediante un sistema de ensayo específico (B). Todos los resultados se describen con su media y desviación estándar. Las diferencias en los niveles de expresión de ARNm de MMP-9 entre el grupo control (CT:  $0,25 \pm 0,04$ ) y los diferentes grupos de HC por VHC y CH por VHC (HCL, HCG y CH:  $0,55 \pm 0,08$ ;  $0,8 \pm 0,1$  y  $1 \pm 0,2$ , respectivamente) fueron significativas, al igual que la CH y la HCG respecto la HCL ( $p < 0,01^{**}$ ), no así entre la CH y la HCG ( $p = 0,08$ ). La diferencia en los niveles de actividad de MMP-9 en el grupo control (CT:  $65 \pm 9$  pg/mg) y la HCL ( $75 \pm 8$  pg/mg) respecto a la HCG ( $130 \pm 12$  pg/mg) y la CH ( $182 \pm 35$  pg/mg) fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,001^{***}$ ), respectivamente. No se demostraron diferencias



entre la actividad de MMP-9 en el grupo control y la HCL, si existiendo entre la CH y la HCG ( $p < 0,05^*$ ).

#### 4.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN INTRAHEPÁTICA DE LA COX-2 CON PARÁMETROS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO EN LOS PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VHC

En los 27 pacientes con HC por el VHC sin CH histológica se analizó la existencia de asociación entre los niveles de expresión intrahepática de la COX-2, determinados por Western Blot, y las características clínicas y analíticas expresadas en la tabla 6.

**TABLA 6**

Características pacientes con HC por el VHC

	HCL (N=22)	HCg (N=5)	Total (N=27)
Edad (años)	43,8 ± 8,3	43 ± 10,8	43,6 ± 8,6
Sexo (M/F) (%)	63,6 / 36,4	100 / 0	70,4 / 29,6
GPT (U/l)	83,3 ± 40,9	140 ± 48,3	93,8 ± 47,1
Genotipo VHC (%) (1 / No 1)	71,4 / 28,6	60 / 40	69,2 / 30,8
Carga viral VHC (UI/ml)			
> 500000	77,3	100	81,5
< 500000	22,7	0	18,5
Grado (%)			
0-1	77,3	0	63
2-4	22,7	100	37
Estadio (%)			
0-1	100	0	81,5
2-4	0	100	18,5

Al comparar los grupos de HCL y HCG por VHC se demostró una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones séricas de GPT entre ambos grupos ( $p=0,012$ ), no observándose diferencias desde el punto de vista estadístico entre ambos grupos para la edad, el sexo, el genotipo y carga viral de los pacientes ( $p>0,05$ ).

No se demostraron correlaciones estadísticamente significativas entre la edad y la concentración sérica de GPT con los niveles de expresión intrahepática de la COX-2 (coeficientes  $r$  de  $-0,121$  y  $-0,275$ , respectivamente,  $p>0,05$ ). Tampoco se demostró la existencia de una asociación entre el sexo, el genotipo (1 vs. no-1) y la carga viral de los pacientes, y los niveles de expresión intrahepáticos de la COX-2 ( $p>0,05$ ).

#### **5.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN INTRAHEPÁTICA DE LA COX-2 CON EL GRADO Y ESTADIO HISTOLÓGICO DE LOS PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VHC**

En la tabla 6 se describe el grado y el estadio histológico de los pacientes con HCL y HCG. Al analizar los resultados de la expresión intrahepática de la COX-2 en los pacientes con infección crónica por el VHC se demostró un nivel progresivo de expresión de la COX-2 más alto en relación con una mayor gravedad de la lesión histológica. De cara a poder valorar si este aumento de la expresión intrahepática de la COX-2 se relaciona con el grado de lesión

necroinflamatoria y/o con el estadio fibrótico, se agrupó a los pacientes según presentaran necrosis periportal (G 0-1 vs. G 2-4), para la valoración del grado, y de fibrosis más allá del espacio porta (E 0-1 vs. 2-4), para el estadio. De este modo no se demostraron diferencias en los niveles de expresión intrahepáticos de la COX-2 con el grado necroinflamatorio ( $0,53 \pm 0,2$  vs.  $0,52 \pm 0,1$ ,  $p > 0,05$ ). Tampoco se observó diferencias en el estadio de fibrosis, aunque existía una tendencia estadística, no significativa, a unos mayores niveles de expresión de la COX-2 en los pacientes con estadios de fibrosis más elevados ( $0,64 \pm 0,1$  vs.  $0,50 \pm 0,1$ ,  $p = 0,093$ ). Si incluimos a los pacientes con infección crónica por el VHC que presentan una CH (estadio 4) se demuestra una asociación entre el estadio de fibrosis elevado (2-4) y niveles de expresión intrahepática de la COX-2 ( $0,71 \pm 0,2$  vs.  $0,5 \pm 0,1$ ,  $p < 0,01$ ).

# DISCUSIÓN

La infección por el VHC es endémica en todo el mundo con una prevalencia global entorno al 3%, siendo variable según las regiones. Esta prevalencia supone unos 170 millones de personas infectadas a nivel mundial (13). El VHC junto al VHB han sido implicados como los principales factores etiológicos de CHC, al sumar entre ambos más del 80% de los casos de CHC en el mundo. En todo caso, la CH por sí misma e independientemente de la etiología, es un factor de riesgo de CHC y la mayoría de los pacientes con infección por VHC tienen una CH de base (105,106). Por lo que permanece la controversia en cuanto al papel carcinogénico hepatocelular del VHC. Sin embargo, estudios con ratones transgénicos indican que la proteína del core y proteínas no estructurales (región NS) del VHC tienen un potencial papel carcinogénico (178).

La COX es la enzima que cataliza la transformación del AA a  $PGH_2$ , de la que derivan los diferentes prostanoïdes que actúan sobre múltiples vías de señalización intracelulares, modulando un amplio espectro de funciones fisiológicas e interviniendo en diferentes condiciones patológicas. En 1989 Simmons y cols (114) identificaron una segunda isoforma de la enzima COX con una estructura muy similar pero diferente en cuanto a su patrón de expresión y biología. Esta nueva enzima denominada COX-2, en contraposición a la COX-1 con una expresión constitutiva y con funciones homeostáticas, se induce en respuesta a diferentes estímulos celulares (109,110,115,116) y además de una función de apoyo a la COX-1, actuaría como un sistema de producción de PG

independiente con una acción central en la replicación y diferenciación celular (117).

En relación con el hígado está descrito que la COX-2 no se expresa en el hepatocito en condiciones normales, y su expresión sugiere desdiferenciación celular (121,122). En condiciones patológicas, tanto la COX-2 como las PG derivadas de su actividad han sido implicadas en proliferación de los hepatocitos (123,124,179,180), en la remodelación tisular (125) y en la hipertensión portal (126-131), hechos relacionados con la patogenia de las hepatopatías crónicas, la CH y sus complicaciones, como el CHC.

Dadas las observaciones previas, los dos primeros objetivos de nuestro estudio de Tesis Doctoral fueron determinar el patrón de expresión y localización de la COX-2 en la HC por el VHC y su relación con la gravedad de la lesión hepática. Los resultados obtenidos demuestran que la COX-2 se expresa intensamente en el tejido hepático de pacientes con infección crónica por el VHC. De este modo se demuestra, en los análisis por Western Blot, un aumento significativo de la expresión intrahepática de la COX-2 en pacientes con HCL, la HCG y en la CH por el VHC respecto a pacientes con esteatosis no alcohólica e hígado histológicamente normal. El análisis inmunohistoquímico del tejido hepático de los pacientes con infección crónica por el VHC reveló un patrón de expresión de la COX-2 hepatocelular diferente según el grupo histológico evaluado. De esta forma, la expresión predominante de la COX-2 a nivel de los hepatocitos se observó únicamente en las formas avanzadas de enfermedad























































































