

COMUNICACIONES ORALES

Sesión general 1

Moderadores: Valentín Cuervas Mons (Madrid) y Lluís Castells (Barcelona)

RELACIÓN DE LA MORTALIDAD EN LOS DOS AÑOS SIGUIENTES AL TRASPLANTE HEPÁTICO CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR

J.I. Herrero, J. Martí, L. Lladó, J. Ortiz de Urbina, M.A. Gómez, E. Otero, C. Jiménez, J. Rodrigo, F. Suárez, E. Fraga, T. Serrano, A. Ríos, P. López, A. Noblejas, E. Fábrega, en representación de los miembros del Fórum Hepático
Clinica Universitaria de Navarra, Pamplona; Hospital Clinic, Barcelona; Hospital de Bellvitge, Barcelona; Hospital de Cruces, Bilbao; Hospital Virgen del Rocío, Sevilla; Hospital Clínico, Santiago; Hospital Doce de Octubre, Madrid; Hospital Carlos Haya, Málaga; Hospital Juan Canalejo, La Coruña; Hospital Reina Sofía, Córdoba; Hospital Clínico, Zaragoza; Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia; Hospital Ramón y Cajal, Madrid; Clínica Puerta de Hierro, Madrid.

En los últimos años, se someten a trasplante hepático pacientes con un perfil cardiovascular desfavorable. Se desconoce si este perfil tiene impacto sobre la supervivencia de los pacientes.

Objetivo: Analizar la posible influencia de los factores de riesgo cardiovascular sobre la supervivencia tras el trasplante hepático.

Pacientes y métodos: Se estudiaron de forma prospectiva 1990 pacientes trasplantados en 15 centros españoles. Se valoró la supervivencia de los pacientes en los primeros dos años, de acuerdo a las principales variables previas al trasplante (edad, sexo, indicación del trasplante, factores de riesgo cardiovascular, antecedentes de patología cardiovascular previa al trasplante) y tratamiento inmunosupresor.

Resultados: La supervivencia de los pacientes al año y a los dos años del trasplante fue 87,5% y 82,9%, respectivamente. En el estudio univariado, las siguientes variables se asociaron a una menor supervivencia: mayor edad, dislipemia, diabetes, tratamiento con insulina, hiperuricemia, insuficiencia renal, obesidad, antecedentes de patología cardiovascular, indicación del trasplante y tratamiento inmunosupresor. En el análisis de regresión de Cox multivariado, tuvieron relación independiente con la mortalidad, la edad en años (HR: 1.014; P = 0,017), diabetes en tratamiento con insulina (HR: 1.592; P < 0,001), hiperuricemia (HR: 1.469; P = 0,003), insuficiencia renal (HR: 1.704; P < 0,001), patología cardiovascular previa al trasplante (HR: 1.455; P = 0,026), enfermedad por la que se indicó el trasplante (cirrosis por virus C, HR: 1.875; P < 0,001; hepatocarcinoma, HR: 1.369; P = 0,008; retrasplante, HR: 1.774; P = 0,002) y el tratamiento inmunosupresor con ciclosporina (HR: 1.236; P = 0,04).

Conclusión: Los factores de riesgo y los antecedentes de enfermedades cardiovasculares previos al trasplante hepático, tienen un impacto significativamente negativo sobre la supervivencia de los pacientes trasplantados).

LA ESTEATOSIS DEL DONANTE COMO FACTOR DE RIESGO DE SUPERVIVENCIA DEL INJERTO Y RECURRENCIA VIRAL EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO POR HEPATITIS C

J. Briceño Delgado^a, R. Ciria Bru^a, M. Pleguezuelo Navarro^b, A. Naranjo Torres^a, J.M. Sánchez Hidalgo^a, A. Luque Molina^a, S. Rufián Peña^a, M. de la Mata García^b y P. López Cillero^a

^aUnidad de Cirugía Hepatobiliar y Trasplante Hepático. Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. ^bUnidad de Hepatología y Trasplante Hepático. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Introducción: No existen conclusiones firmes acerca de la influencia que un órgano esteatósico ejerce sobre un trasplante por virus de

la hepatitis C respecto a supervivencia del injerto y grado de recurrencia viral postrasplante.

Pacientes y métodos: Se han incluido 120 trasplantes consecutivos por cirrosis debida a VHC. El grado de esteatosis fue catalogado en: no esteatosis (0-10%; n = 40; 33%), leve (10-30%; n = 32; 26,9%), moderada (30-60%; n = 29; 24,4%) y severa (> 60%; n = 19; 16%). Se analizaron, sin obtenerse diferencias, las características entre los distintos grupos de sexo, edad, tiempo de isquemia fría y MELD del receptor. La supervivencia del injerto se analizó con el test de Kaplan Meier (test exacto log rank). La recurrencia viral fue medida en periodos de 3 meses tras el trasplante y detectada mediante niveles elevados de transaminasas, biopsia y/o PCR de RNA-VHC. Las proporciones de recurrencia para cada categoría de esteatosis fueron comparadas (corrección de Bonferroni).

Resultados: 56 injertos se perdieron (46%) durante el periodo de seguimiento. La supervivencia de los injertos disminuyó con el incremento de la esteatosis de los injertos donantes: 82%, 72% y 72% a 1, 2 y 3 años tras el trasplante con injerto no esteatósico; 73%, 63% y 58% respectivamente con esteatosis leve; 74%, 62% y 43% respectivamente si la esteatosis fue moderada; y 62%, 49% y 42%, respectivamente, con esteatosis severa (chi-square = 5.793; P = 0,012). La recurrencia viral fue más precoz y más frecuente en receptores de injertos con esteatosis > 30% (46% vs 32% a 3 meses, p = 0,017; 58% vs 43% a 6 meses, p = 0,020; 70% vs 56% a 12 meses, p = 0,05; y 95% vs 69% a los 3 años postrasplante, p = 0,0001).

Conclusiones: La recurrencia de hepatitis C fue más frecuente y más precoz en receptores de órganos con esteatosis moderada y severa y contribuye a una menor supervivencia del injerto con elevado contenido de grasa. El trasplante con injertos que presenten una esteatosis > 30% debería ser restringido en receptores con VHC.

¿CUÁL ES EL RIESGO DE TRANSMISIÓN DE HEPATITIS B EN LOS INJERTOS HEPÁTICOS PROCEDENTES DE DONANTES ANTI-HBC POSITIVOS?: RESULTADOS A LARGO PLAZO DE UNA ESTRATEGIA DE ASIGNACIÓN SELECTIVA

M. Prieto^a, A. Rubín^a, E. Pareja^b, M. Berenguer^a, V. Aguilera^a, S. Benlloch^a, F. Sanjuán^b y J. Mir^a

^aServicio de Medicina Digestiva, Hospital U La Fe, Valencia. ^bUnidad de Cirugía y Trasplante Hepático, Hospital U La Fe, Valencia.

Los injertos hepáticos de donantes HBsAg- anti-HBc+ se utilizan para aumentar el pool de donantes a pesar del riesgo conocido de transmisión de hepatitis B. Existen varias estrategias para reducir el riesgo de hepatitis B pero éstas varían según los centros.

Objetivos: Analizar los resultados a largo plazo de una estrategia basada en dirigir los injertos anti-HBc+ preferentemente a receptores anti-HBs+ y/o anti-HBc positivos, no realizándose profilaxis farmacológica salvo en los pacientes trasplantados por hepatitis B. En ausencia de estos receptores, los injertos anti-HBc+ son implantados en receptores anti-HBs- anti-HBc-, administrándose profilaxis farmacológica.

Resultados: Desde el 1-1-99 hasta el 31-12-06, 124 pacientes han recibido un hígado de un donante anti-HBc+, limitándose el análisis a 103 pacientes con seguimiento serológico VHB mínimo de 3 meses post-TH (mediana: 44 m, rango: 3-97). Globalmente, 13 (12,6%) de los receptores de un injerto anti-HBc+ desarrollaron hepatitis B, definida como positivización del HBsAg. En los pacientes trasplantados por hepatopatía VHB (n = 15) que recibieron

un injerto anti-HBc+, sólo 1 (6,7%) desarrolló hepatitis B tras recidiva de hepatocarcinoma. En los 42 receptores HBsAg- con algún tipo de anticuerpo frente al VHB, el riesgo de hepatitis B varió según el perfil serológico del receptor en el momento del TH (tabla 1)

Perfil VHB pre-TH	n.º receptores	Hepatitis B (n, %)
Anti-HBs+ aislado	4	0 (0%)
Anti-HBc+ y anti-HBs+	22	1 (4,5%)
Anti-HBc+ aislado	16	3 (18,8%)

En los 46 pacientes naïve (anti-HBs- y anti-HBc-) que recibieron un injerto anti-HBc+, se administró profilaxis en 38 (GGHI n = 8, GGHI + lamivudina n = 3, lamivudina n = 27). En 8 receptores, no se administró profilaxis farmacológica. La prevalencia de hepatitis B fue 50% (4 de 8) en los receptores sin profilaxis vs 10,5% (4 de 38) en los que recibieron profilaxis (p = 0,007). De los 27 pacientes que recibieron lamivudina aislada como profilaxis, sólo 1 (3,7%) desarrolló hepatitis B frente a 3 (37,5%) de los que recibieron GGHI aislada (p = 0,04). La probabilidad de supervivencia al 1º, 3º y 5º año post-TH fue 92%, 76% y 56% en los receptores que desarrollaron hepatitis B frente a 95%, 82%, y 74% en los receptores sin hepatitis B post-TH (p = ns).

Conclusiones: La utilización de injertos hepáticos de donantes HBsAg- anti-HBc+ constituye un método seguro de ampliar el pool de donantes. Estos resultados sugieren que estos injertos deben ser utilizados en primer lugar en pacientes trasplantados por hepatitis B o en aquellos con marcadores serológicos de exposición previa al VHB. En este último grupo se pueden establecer diferentes grupos de riesgo en base al perfil serológico VHB pre-TH. Finalmente, estos resultados confirman el riesgo alto de hepatitis B en receptores anti-HBs- anti-HBc- sobre todo si no se utiliza profilaxis o ésta se basa en la administración de GGHI.

LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE IL1R Y DE IL6 SE RELACIONAN CON LA GRAVEDAD DE LA RECIDIVA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) Y CON EL RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DESPUÉS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

I. Baños^a, M.J. Citores^b, S. Rosado^b, R. Castejón^b, A. Noblejas^a, P. Durán^a, J.A. Vargas^b y V. Cuervas-Mons^a

^aUnidad de Trasplante Hepático y ^bServicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid.

Las citocinas, cuya producción está en parte regulada genéticamente, se relacionan íntimamente con los procesos inmunológicos que tienen lugar tras el trasplante hepático por VHC, pudiendo influir en la evolución de los mismos. Nuestro objetivo fue valorar la influencia de diferentes polimorfismos genéticos de citocinas en la evolución de la enfermedad por VHC en el injerto en pacientes trasplantados. Para ello, se han analizado en 90 pacientes trasplantados por VHC, 15 polimorfismos de sustitución de 10 citocinas (IL6-174, TNFa-238, TNFa-308, IL10-1082, IL10-819, IL10-592, IFNg+874, IL12-1188, IL1a-889, IL1b-511, IL1b+3962, IL1R+1970, IL1Ra+11100, TGFb+869 y TGFb+915) mediante hibridación con sondas aleloespecíficas y análisis en el sistema Luminex.

El genotipo IL1R+1970-TT se asoció con un mayor riesgo de desarrollar cirrosis en los 5 primeros años post-trasplante (*Odds ratio* (OR) = 8,2, intervalo de confianza al 95% (IC) = 1-68,5, p = 0,036), con una sensibilidad (S) del 21,1%, especificidad (E) del 97,4%, valor predictivo positivo (VPP) del 80% y valor predictivo negativo (VPN) del 71,1%. Por otra parte, el alelo IL6-174C confiere un mayor riesgo de rechazo agudo del injerto (OR = 2,2, IC = 1,2-3,9, p = 0,015), con S = 30,3%, E = 86%, VPP = 55,6% y VPN = 68,1%.

En resumen, el polimorfismo genético del receptor de la IL1 influye en la gravedad de la recidiva del VHC (cirrosis precoz) después del trasplante hepático, y el polimorfismo de IL6 se asocia con el rechazo agudo del injerto.

ANÁLISIS PRECOZ DE LOS BIOMARCADORES SÉRICOS DE FIBROSIS TRAS EL TRASPLANTE HEPÁTICO: UTILIDAD EN LA HEPATITIS C RECURRENTE

M. Salcedo^a, D. Micheloud^b, D. Rincón^a, S. Resino^b, G. Clemente^a, M.V. Catalina^a, O. Núñez^a, E. Álvarez^c, M.A. Muñoz-Fernández^b y R. Bañares^a

^aUnidad de Trasplante Hepático, ^bLaboratorio de Inmunobiología,

^cDepartamento de Anatomía Patológica. Hospital General

Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

La hepatitis C (HVC) tras el trasplante hepático (TH) es el principal condicionante de la evolución a largo plazo; el desarrollo de hipertensión portal (HP) y fibrosis al año del TH se han asociado a mal pronóstico, con menor supervivencia. Diversos marcadores séricos se han relacionados con la progresión de la fibrosis, en pacientes no trasplantados con hepatitis C.

Objetivo: Análisis de los biomarcadores de fibrogénesis en el período precoz postrasplante (a los 3 meses del TH) como factores predictivos de hepatitis C recurrente grave, considerada ésta como el desarrollo de fibrosis y/o hipertensión portal al año del TH.

Pacientes y métodos: Se incluyeron 37 TH consecutivos (19 por cirrosis VHC y 18 por cirrosis etílica, grupo control); todos recibieron inmunosupresión con anticalcineúricos y esteroides. Se analizaron parámetros de función hepática y marcadores séricos de fibrosis a los 3 meses del TH, tras descartar rechazo y complicaciones técnicas. Se consideró hepatitis C grave (HCG) en caso de fibrosis \geq F1 (score Metavir) y/o hipertensión portal (GPVH > 6 mmHg) al año del TH. Los biomarcadores estudiados al 3º mes incluyeron los relacionados con inflamación y quimiotaxis (TNF- α , IP-10, MCP-1, RANTES, MIP-1B), angiogénesis (VEGF, HGF, Ang2), adipoquinas (insulina, índice HOMA, Leptina), activación endotelial (sVCAM-1, sVCAM-1), degradación de la matriz extracelular (MMP-9, TIMP-1) y síntesis de colágeno (ácido hialurónico, AH), analizados en un panel mediante inmunoensayo (Luminex 100™ analyzer) y ELISA; los valores se expresan como mediana y rango intercuartílico.

Resultados: 12 de 19 pacientes mostraron hepatitis C grave. A los 3 meses del TH éstos presentaron mayores niveles de IP10, sVCAM-1 y ácido hialurónico, que los pacientes con hepatitis C leve y que los controles: IP10 [(820 (2409), 348 (280), 180 (240) pg/ml], sVCAM-1 [2466 (839), 1266 (916), 1354 (1330) ng/ml], ácido hialurónico [624 (246), 434 (351), 326 (207) pg/ml]. Mediante curvas ROC se identificaron como valores predictivos de HCG: IP10 > 590: 0,74 (0,5-0,9); sVCAM-1 > 1481: 0,89 (0,7-1), y ácido hialurónico > 461: 0,70 (0,5-0,9).

Conclusión: Los niveles séricos de IP-10, sVCAM-1 y ácido hialurónico a los tres meses del TH se asocian a recidiva grave de la hepatitis C. La evaluación de estos biomarcadores puede identificar a los pacientes con mal pronóstico, que se pueden beneficiar de medidas terapéuticas específicas y precoces.

ALTERACIONES CEREBRALES EN PACIENTES TRASPLANTADOS POR CIRROSIS HEPÁTICA DEMOSTRABLES POR RESONANCIA MAGNÉTICA CEREBRAL Y MORFOMETRÍA BASADA EN VOXEL

M.E. Baccaro^{1,2,3}, M. Guevara^{1,2,3}, B. Gómez-Anzón⁴, G.C. Monté-Rubio^{3,4}, L. Rami⁵, E. Urtasun-Sotil^{1,2}, M.N. Pepín¹, M. Martín-Llahí^{1,2,3}, A. Nazar^{1,2}, V. Arroyo^{1,2,3} y P. Ginés^{1,2,3}

¹Unidad de Hepatología, Hospital Clínic de Barcelona. ²IDIBAPS.

³CIBERehd. Ciber de Enfermedades Hepáticas y Digestivas. ⁴Servicio de Radiología, Hospital de Sant Pau. ⁵Servicio de Neurología, Hospital Clínic. Barcelona.

Las alteraciones neurológicas en la cirrosis hepática se habían considerado clásicamente de tipo funcional. Investigaciones recientes indican que en la cirrosis hepática existen alteraciones cerebrales demostrables por pruebas radiológicas, que consisten en áreas de menor densidad y aparente pérdida de sustancia cerebral, que son más frecuentes conforme progresa la enfermedad. Se desconoce si estas alteraciones revierten tras el trasplante hepático. El objetivo del presente estudio fue investigar la existencia de alteraciones en el parénquima cerebral en pacientes trasplantados por cirrosis hepática. Se incluyó en el estudio a 12 pa-

cientes trasplantados que se compararon con dos grupos control: uno constituido por 12 pacientes con cirrosis pareados con los pacientes trasplantados por edad, sexo, etiología de la cirrosis y severidad de la insuficiencia hepática en el momento del trasplante, y un grupo de 12 voluntarios sanos pareados por edad y sexo. Las alteraciones cerebrales se investigaron mediante resonancia nuclear magnética (RNM) y morfometría basada en voxel, una técnica que permite comparar la densidad del tejido cerebral. La comparación no puede ser realizada de forma individual entre pacientes, sino entre grupos de individuos. A todos los sujetos incluidos se les realizó una RNM y pruebas de función neuropsicológica. Los pacientes trasplantados fueron estudiados una mediana de 11 meses (rango: 7-50 meses) después del trasplante. Los pacientes con cirrosis hepática presentaban abundantes áreas de menor densidad de la sustancia gris (SG), en especial en las regiones prefrontal, giro cingulado, temporal y parietal, en comparación con los controles. Asimismo, existían numerosas zonas de menor densidad de la sustancia blanca (SB), en especial en ambas regiones prefrontales. Los pacientes trasplantados presentaban una reducción de las zonas de menor densidad tanto en la SG como en la SB, en especial en zonas frontales y temporales, en comparación con los pacientes con cirrosis. No obstante, cuando se comparó los pacientes trasplantados con los controles persistían determinadas áreas de menor densidad cerebral, tanto en la SG como en la SB. Los resultados de las pruebas neuropsicológicas demostraron que los pacientes con cirrosis presentaban una alteración significativa de las pruebas en comparación con los controles, mientras que no existieron diferencias significativas en el resultado de las pruebas entre pacientes con cirrosis y pacientes trasplantados. En conclusión, estos resultados indican que las alteraciones cerebrales consistentes en una disminución de la densidad cerebral que se observan en los pacientes con cirrosis disminuyen pero no desaparecen tras el trasplante hepático. Ello sugiere que la cirrosis hepática se acompaña de alteraciones neurológicas cerebrales irreversibles. La relevancia de estas alteraciones y su posible impacto sobre la calidad de vida de los pacientes trasplantados deberían ser estudiados en el futuro.

RIESGO DE CARCINOMAS EN PACIENTES RECEPTORES DE TRASPLANTE HEPÁTICO. ANÁLISIS DE UN PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO PRECOZ

J.I. Herrero, F. Alegre, J. Quiroga, M. Iñarrairaegui, B. Sangro, F. Rotellar, C. Montiel y J. Prieto

Las neoplasias *de novo* son una complicación frecuente tras el trasplante hepático. Las neoplasias más frecuentes son las cutáneas y

los síndromes linfoproliferativos. Sin embargo, el riesgo de otros tumores también parece estar incrementado. Se desconoce si los programas de detección precoz pueden ser útiles en los pacientes trasplantados.

Objetivos: Evaluar si los pacientes trasplantados tienen un riesgo aumentado de carcinomas tras el trasplante hepático. Evaluar la eficacia de los programas de diagnóstico precoz de neoplasia *de novo*.

Pacientes y métodos: Se evaluó la incidencia de neoplasias post-trasplante (excluyendo tumores cutáneos y linfomas) en 279 pacientes con un seguimiento post-trasplante mayor de 3 meses. Se investigó el riesgo relativo de neoplasia y de muerte por neoplasia, con respecto al esperable en estos pacientes de acuerdo con su edad y sexo. Se comparó la supervivencia tras el diagnóstico de neoplasia de los pacientes a los que se les diagnosticó la neoplasia como consecuencia de un programa de *screening* (aplicado de forma irregular) con la de los pacientes a los que la neoplasia se les diagnosticó de forma incidental o por ser sintomática.

Resultados: Tras un seguimiento de 1515 pacientes-año, se diagnosticaron 39 neoplasias en 33 pacientes (11 neoplasias a 9 pacientes en estudios de *screening* y 28 neoplasias a 24 pacientes sintomáticos o incidentales). El riesgo relativo (IC 95%) de neoplasia en los pacientes trasplantados con respecto a la población general fue de 2,23 (1,58-3,04). Las incidencias de neoplasias de cabeza y cuello, urológicas y digestivas fueron significativamente mayores que las de la población general. El riesgo relativo de mortalidad por carcinoma (IC 95%) fue de 2,35 (1,39-3,71). No falleció ningún paciente con neoplasia diagnosticada por *screening*, mientras que 18/24 (75%) de los pacientes con neoplasias sintomáticas/incidentales fallecieron como consecuencia de las mismas. La diferencia en la supervivencia de ambos grupos de pacientes alcanzó la significación estadística ($P = 0,003$)

Conclusión: Los receptores de un trasplante hepático tienen una incidencia de carcinoma y una mortalidad por carcinoma significativamente mayores que las de la población general. Los pacientes con neoplasias diagnosticadas en programas de *screening* tienen una supervivencia tras el diagnóstico del tumor mayor que la de los pacientes con neoplasia sintomática o incidental. Los programas de diagnóstico precoz de neoplasia pueden tener una repercusión positiva sobre la supervivencia de los receptores de trasplante hepático.

Sesión general 2

Moderadores: Xavier Forn (Barcelona) y Dolores Quintero (Granada)

ESTUDIO PROSPECTIVO MULTICÉNTRICO EN 105 PACIENTES CON TROMBOSIS PORTAL AGUDA: RESULTADOS DEL EUROPEAN NETWORK FOR VASCULAR DISORDERS OF THE LIVER (EN-VIE)

M. Hernández-Guerra y J.C. García-Pagán for the EN-Vie Hospital Clínic, Barcelona.

Introducción: Actualmente, basado en datos retrospectivos de pequeñas series de pacientes con trombosis portal aguda (TPA), se recomienda la anticoagulación precoz para evitar el infarto intestinal y prevenir el desarrollo de cavernomatosis portal.

Objetivos: Evaluar la incidencia y factores predictivos de reperfusión en pacientes no-cirróticos con TPA no-tumoral. Se incluyeron pacientes consecutivos con dolor abdominal y pruebas de imagen mostrando trombosis reciente del tronco portal principal o de ramas principales en ausencia de cavernoma, en 9 centros hospitalarios europeos (años 2003-2006). Se analizó el grado de reperfusión del eje esplenoportal, la tasa de sangrado intestinal, infarto o muerte.

Resultados: Se incluyeron 105 pacientes (53 hombres) seguidos una mediana de 229 días (0-944). 91 (87%) pacientes presentaban trombosis de la vena porta extrahepática y 29 (28%) presentaban además obstrucción completa de la vena mesentérica y esplénica. En un 25% de pacientes se halló un factor local como desencadenante. Otras situaciones procoagulantes fueron: mutación gen protrombina (19%), enfermedad mieloproliferativa 22%, factor V Leiden (14%), déficit proteína-S (9%), homocigotos mutación C677T-MTHFR (4%); contraceptivos orales (22%).

El 97% de pacientes recibió anticoagulación precoz (mediana 0 días tras diagnóstico: 0-55). El 44 % de los pacientes reperfundieron los vasos trombosados al año. La ascitis radiológica fue el único factor independiente predictivo de ausencia de reperfusión (65% en ascitis vs 38% en sin ella ($p = 0,02$)). Ni el tipo ni el número de factores procoagulantes fueron factores predictivos de reperfusión. Nueve enfermos anticoagulados presentaron una hemorragia (5 gastrointestinal, 2 epistaxis y 2 por procedimientos invasivos). Ninguno sufrió un infarto intestinal. Dos pacientes fallecieron (1 sepsis; 1 enfermedad tumoral).

Conclusiones: En esta cohorte prospectiva, la anticoagulación precoz logra la reperfusión en un 44% de pacientes al año de seguimiento, independientemente de la causa con una baja tasa de sangrado y de mortalidad, lo que apoya el uso de anticoagulación precoz en estos enfermos. Sin embargo, un 65% de los pacientes con ascitis, a pesar de recibir anticoagulación, no lograron reperfundir la trombosis y en ellos deberían evaluarse tratamientos alternativos.

Financiado en parte por V programa marco (QLG1-CT-2002-01686) y la Fundación para el estudio de las enfermedades del hígado.

ACTIVACIÓN DE MTOR EN EL CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC): CORRELACIONES PRONÓSTICAS Y EFECTO ANTINEOPLÁSICO DEL BLOQUEO COMBINADO DE EGFR/MTOR EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CHC

A. Villanueva¹, D.Y. Chiang², P. Newell¹, J. Peix¹, S. Thung¹, C. Alsinet³, B. Minguez¹, S. Roayaie¹, M. Sole³, C. Battistion⁴, S. Van Laarhoven¹, M.I. Fiel¹, A. Di Feo¹, Y. Hoshida², V. Tovar³, S. Yea¹, J. Martignetti¹, V. Mazzaferro⁴, J. Bruix³, S. Waxman¹, M. Schwartz¹, M. Meyerson², S.L. Friedman¹ y J.M. Llovet^{1,3}

Mount Sinai Liver Cancer Program, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA¹, Cancer Program, Broad Institute, Boston², Barcelona Clinic Liver Cancer Group, Hospital Clínic Barcelona, Spain³, National Cancer Institute, Milan, Italy⁴.

Introducción: La elevada morbi-mortalidad y la escasez de terapias sistémicas eficaces en el manejo terapéutico del CHC obliga a pro-

fundizar en los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo y progresión, con el fin último de desarrollar nuevas terapias.

Objetivos: 1) Determinar el nivel de activación y repercusiones clínicas de la vía de señalización Akt/mTOR en el CHC así como, 2) conocer el efecto antineoplásico de su bloqueo a dos niveles con inhibidores selectivos (AEE788 y RAD001).

Material y métodos: Se analizó la vía Akt/mTOR siguiendo un abordaje integral en 103 pacientes con CHC asociado a VHC. Se estudiaron alteraciones estructurales del ADN (Chips Affymetrix 238K- SNP-arrays) y niveles de mRNA (Taqman Assay) de IGF2, IGF1, IGFBP3, PTEN, EGR, EGF, mTOR, RAPTOR y RICTOR. Paralelamente, se analizaron perfiles de expresión genética (Chips Affymetrix U133 Plus 2.0 arrays), nivel de activación proteica (inmunohistoquímica de p-EGFR, p-Akt, p-mTOR y p-S6), mutaciones en PTEN y PI3K (subunidades A y B) y se estudiaron correlaciones entre activación de la vía Akt/mTOR y variables clínicas (recurrencia y supervivencia). Por último, se estudió el efecto anti-neoplásico de AEE788 (inhibidor de EGFR/HER2/VEGFR) y RAD001 (inhibidor de mTOR) en xenoinjertos de CHC en ratones inmunodeprimidos analizando variables clínicas (volumen tumoral y supervivencia) y biomarcadores de actividad oncogénica (Ki-67 y TUNEL).

Resultados: El 54,1% (40/74) de los pacientes con CHC asociado a VHC presenta activación de S6. La firma genética generada que identifica éstos tumores está enriquecida por genes relacionados con síntesis proteica, regulación postranslacional y progresión del ciclo celular ($p < 0,05$). La activación de S6 se asocia a mal pronóstico (mediana supervivencia en pS6 positivos y negativos es de 19 vs 43 meses, respectivamente, $p = 0,02$). Se identifican amplificaciones supraselctivas en la región de ADN codificante de RICTOR (Complejo mTOR2) en un 14% (20/99) de los pacientes, lo que se asocia significativamente a mayor riesgo de recurrencia tumoral (mediana de tiempo hasta recurrencia de 7 meses vs 18 meses en pacientes sin amplificación de RICTOR, $p = 0,03$). Los estudios *in vivo* muestran que AEE788 y RAD001 disminuyen significativamente el crecimiento tumoral e incrementan la supervivencia ($p < 0,05$). El mecanismo de acción combina inhibición de la proliferación celular e incremento significativo en la apoptosis. Ambas drogas son seguras a dosis terapéuticas.

Conclusiones: La activación de la vía de señalización de mTOR afecta a la mitad de los CHC iniciales, y se asocia a un peor pronóstico, siendo la amplificación de RICTOR una nueva potencial diana terapéutica. El bloqueo de la vía Akt/mTOR disminuye el crecimiento tumoral e incrementa la supervivencia en un modelo animal de CHC sin presentar toxicidad significativa. Por tanto, existe base racional para el inicio de ensayos clínicos con inhibidores de mTOR en CHC humano.

ASOCIACIÓN ENTRE EL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR VHC Y EL DESARROLLO DE UN RESERVORIO CELULAR CITOTÓXICO ESPECÍFICO PD1 NEGATIVO

S. Benito^a, J.R. Larrubia^{a,b}, E. Sanz-de-Villalobos^b, M. Calvino^a, M.L. García-Buey^c, S. García-Garzón^b, F. González-Mateos^b, A. González-Praetorius^d, J. Miquel^b, A. Bienvenido^b y T. Parra^a

^aUnidad de Investigación, ^bSección de Aparato Digestivo y ^cServicio de Microbiología. Hospital Universitario Guadalajara. Universidad de Alcalá. ^dServicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario de La Princesa Madrid. Universidad Autónoma de Madrid.

Introducción: La molécula co-estimuladora PD1 regula negativamente la respuesta citotóxica específica efectora en infecciones virales no citopáticas mediante la interacción con su ligando PD-L1. La expresión de PD1 en las células citotóxicas VHC específicas po-

dría favorecer la persistencia del VHC. En este estudio se analizan las características de la respuesta citotóxica VHC específica según el grado de control viral.

Material y métodos: Estudio transversal. Se estudiaron 38 pacientes HLA-A2(+) con serología positiva contra VHC, divididos en dos grupos: Grupo A (RNA VHC(+), ALT elevada (hepatitis crónica por VHC)), Grupo B (RNA VHC(-), ALT normal (inmunidad natural y respuesta virológica sostenida tras tratamiento)). Se obtuvieron células mononucleares (CM) de sangre periférica (SP) en ambos grupos y CM intrahepáticas (IH) en el grupo A. Se visualizaron las células CD8(+) específicas contra el epítipo NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ del VHC en SP e IH mediante marcaje con complejos pentaméricos HLA-A2/NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅-Pe (Pent(+)). Se evaluó la capacidad de proliferación *in-vitro* de las células Pent(+) tras estimulación específica y su capacidad para producir interferón- γ tras activación. Se estudió el fenotipo basal y tras proliferación de las células Pent(+), mediante tinción con anticuerpos (Ac) anti-CCR7 y anti-PD1 marcados con FITC. Además, se analizó la expresión de PD-L1 en las células CD8(-) intrahepáticas mediante tinción con Ac anti-PD-L1-FITC. Los análisis se realizaron mediante citometría de flujo. Se utilizaron tests no-paramétricos para las comparaciones entre ambos grupos. Se consideró significativo un valor $p < 0,05$.

Resultados: En los pacientes del grupo A existía un secuestro intrahepático de células Pent(+)/PD1(+) ($p < 0,05$) que se asociaba a una elevada expresión de PD-L1 en las células intrahepáticas CD8(-) ($p < 0,05$). La frecuencia de células Pent(+) en sangre periférica fue similar y muy baja en ambos grupos ($p > 0,05$). Sin embargo, la capacidad proliferativa tras estimulación antígeno específica fue diferente en los grupos comparados ($p < 0,01$). La mayoría de los pacientes del grupo A no presentaron expansión clonal de las células Pent(+), mientras que ésta estuvo presente en el 80% de los casos del grupo B. En los pocos pacientes del grupo A con proliferación de células Pent(+), éstas tenían tras expansión un fenotipo PD1(+) e IFN- γ bajo. En cambio, en el grupo B las células Pent(+) presentaban un fenotipo (CCR7(+), PD1(-), IFN- γ bajo) que se transformaba en (CCR7(-), PD1(-), IFN- γ alto) tras expansión clonal ($p < 0,05$).

Conclusiones: La persistencia del VHC se asocia a una respuesta celular citotóxica específica anérgica PD1(+) que podría interactuar en el hígado infectado con la población mayoritaria de células intrahepáticas PD-L1(+). El control persistente de la infección por VHC se asocia al desarrollo de un reservorio celular citotóxico PD1(-) que muestra una capacidad efectora adecuada tras encuentro antigénico.

PAPEL DE LA PROTEÍNA RIBOSOMAL S6K1 EN EL BALANCE SUPERVIVENCIA/MUERTE CELULAR EN EL HÍGADO

A. González-Rodríguez^a, J. Alba^a, B. Díez López-Ayllón^a, S. Kozma^b y A.M. Valverde^a

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (Centro Mixto CSIC/UAM) C/ Arturo Duperier 4, 28029 Madrid. ^bGenome Research Institute. University of Cincinnati, 45237 Cincinnati, OH, USA.

Introducción: La ruta mTOR/S6K1 controla diferentes funciones celulares entre las que se encuentran la proliferación y el crecimiento de la masa celular. La insulina, IGF-I, EGF son factores de supervivencia de los hepatocitos. En las rutas de señalización mediadas por sus receptores, todos ellos de la superfamilia tirosina quinasa, la proteína ribosomal S6K1 resulta activada.

Objetivo: Investigar si la deficiencia en S6K1 tiene consecuencias en el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular en el hígado.

Material y métodos: Hemos generado líneas celulares de hepatocitos inmortalizados a partir de hígados de ratones neonatos de genotipos salvaje (S6K1^{+/+}) y deficientes en S6K1 (S6K1^{-/-}). Dichas células se han sometido a dos protocolos de inducción de muerte celular por apoptosis: activación de receptores de muerte (TNF y Fas) y retirada de los factores tróficos del medio de cultivo. Además, con

objeto de estudiar si la falta de S6K1 afecta al daño hepático fulminante, hemos realizado experimentos *in vivo* inyectando a ratones adultos de ambos genotipos concanavalina A.

Resultados: La falta de S6K1 confiere protección frente a la apoptosis inducida por activación de receptores de muerte (TNFR y Fas). Este fenómeno se debe a que en ausencia de S6K1 la expresión endógena de la proteína pro-apoptótica Bid está disminuida significativamente, la caspasa-8 no se activa en respuesta a TNF y Jo2 y no se observa degradación de Flip ni truncamiento de Bid en respuesta a dichos ligandos. De hecho, la falta de S6K1 protege del daño hepático fulminante producido por la inyección de concanavalina A. Asimismo, la pérdida de S6K1 evita la apoptosis inducida por la retirada de factores tróficos. Al estudiar el mecanismo molecular, encontramos que en los hepatocitos de genotipo salvaje las rutas de supervivencia están anuladas tras la retirada de suero, mientras que en los hepatocitos S6K1^{-/-} dichas rutas están intactas. Esto es debido a que en ausencia de S6K1 no se inicia la retroalimentación negativa mediada por la actividad serina quinasa esta proteína, que consiste en la fosforilación de IRS-1 en el residuo serina 307 y por tanto, en la disminución de la fosforilación en tirosina del IRS-1. En consecuencia, los hepatocitos S6K1^{-/-} mantienen activada la ruta IRS-1/ PI 3-quinasa que conduce a la activación de las quinasa Akt y ERK que mantienen la supervivencia celular.

Conclusión: La resistencia de los hepatocitos deficientes en S6K1 a la muerte celular por apoptosis podría explicar la resistencia a los compuestos inhibidores de mTOR en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, como el hepatocarcinoma.

TRATAMIENTO DE LA CIRROSIS HEPÁTICA CON VECTORES RECOMBINANTES DE SV40 QUE EXPRESAN IGF-I

L. Sobrevals, A. Pañeda, N. Razquin, N. Juanarena, I. Monreal, P. Alzuguren, C. Olagüe, G. González-Aseguinolaza, C. Rodríguez, J. Prieto y P. Fortes

CIMA, Pamplona.

La cirrosis hepática está asociada a una disminución de los niveles séricos del factor de crecimiento similar a la insulina tipo-1 (IGF-I). La administración de proteína IGF-I recombinante en dosis fisiológicas reduce la fibrosis y diversos síntomas asociados a la cirrosis. Un aporte constante de dicha proteína terapéutica se podría conseguir mediante el uso de virus recombinantes de larga expresión que expresen IGF-I. Por ello, decidimos estudiar si un vector recombinante basado en el virus de simio 40 (SV40) que expresa IGF-I (rSVIGF-I) es capaz de aportar niveles terapéuticos de IGF en un modelo de ratas cirróticas. Así, se indujo cirrosis en rata mediante administración intragástrica de tetracloruro de carbono. Cuando la cirrosis estaba establecida, se inyectó por diferentes vías (intrahepática, intraarterial, hepática e intraportal) una única dosis de rSVIGF-I o un vector control que expresa el gen reportero de la luciferasa. Los animales se sacrificaron 8 semanas después de la inyección del virus y se evaluaron diversos parámetros en suero y en parenquima hepático. Los resultados indican que las ratas tratadas con rSVIGF-I presentan más mRNA de IGF-I y de la proteína de unión a IGF-I tipo 3 (IGFBP3), cuya transcripción se activa en presencia de IGF-I. La expresión de IGF-I coincide con una disminución del daño hepático y de la fibrosis hasta niveles similares a los de ratas sanas. Esto indica que la expresión de IGF-I induce una reversión de la cirrosis hepática en nuestro modelo animal. Encontramos que el grupo de animales tratados con rSVIGF-I presenta un aumento en la expresión de HGF (factor de crecimiento de acción antifibrogénica y hepatoprotectora) y de HNF4- α (factor nuclear que induce expresión de genes hepatocitarios) así como de varias moléculas anti-fibrogénicas (MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-14). Junto a ello se observó una marcada disminución en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (TGF- β y TNF- α) y moléculas pro-fibrogénicas (CTGF, PDGF, VEGF, α -SMA y TIMP-2). Estos resultados indican que el vector rSVIGF-I podría tener aplicación clínica para el tratamiento de la cirrosis hepática.

CONSECUENCIAS SOBRE LA FUNCIÓN MONOCITARIA DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL INCREMENTADA EN ENFERMOS CON CIRROSIS HEPÁTICA Y ASCITIS

C. Rodríguez-Ramos^a, M. Márquez^b, M.J. Soto^{b,c}, M. Montes de Oca^c, M.J. Blanco^a, A. Arizcorreta^c y J.A. Girón^c

^aAparato Digestivo. ^bFundación para la Investigación Puerta del Mar. ^c Medicina Interna. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

Un incremento de la permeabilidad intestinal, detectado a partir de la concentración sérica de la molécula ligadora de LPS (LBP), se correlaciona con el desarrollo de complicaciones y muerte en enfermos con cirrosis.

Objetivo: Análisis de la permeabilidad intestinal en enfermos cirróticos y de sus consecuencias sobre la función monocitaria (expresión de receptores para LPS, de moléculas coestimuladoras y secreción de citocinas proinflamatorias).

Pacientes y métodos: Se analizaron 40 enfermos cirróticos (20 con cirrosis compensada y 20 con ascitis). Como grupo control se seleccionaron 20 controles sanos. Se determinó la concentración sérica de LBP (quimioluminiscencia), el porcentaje de monocitos (CD14+) que expresan receptores de LPS Toll like 4 (TLR4) y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (citometría de flujo con doble marcaje) y la concentración sérica de IL-6 (ELISA en sándwich). Los resultados se expresan como mediana (intervalo intercuartiles).

Resultados: Respecto a controles sanos (3,5 (2,9-5,1) mg/ml), la concentración sérica de LBP está incrementada en enfermos con ascitis (19,7 (12,6-44,3) mg/ml, $p < 0,001$), pero no en aquellos con cirrosis compensada (6,5 (4,0-9,1) mg/ml, $p > 0,05$). Los enfermos con cirrosis descompensada fueron clasificados en función del valor de LBP. Tanto la expresión del receptor TLR4 (47 (13-73) vs 18 (9-45) %, $p = 0,014$) como la concentración de IL6 (24 (6-59) vs 5 (2-12) pg/ml, $p < 0,001$) estaban significativamente aumentadas; la expresión del receptor de estimulación monocitaria CD80 (0,6 (0-2,3) vs 3 (2-5) %, $p = 0,009$) estaba disminuida en enfermos con LBP mientras que la de CD86 estaba aumentada (96 (87-98) vs 85 (82-91) %, $p = 0,026$).

Conclusiones: En enfermos con cirrosis hepática y ascitis, el incremento de permeabilidad intestinal se asocia a modificaciones monocitarias, caracterizadas por una mayor producción de citocinas proinflamatorias y también por la anómala expresión de co-receptores de estimulación de linfocitos T, disminuyendo la proporción de los más eficientes (CD80) e incrementándose la proporción de los menos activos (CD86). Estas modificaciones son propias de estimulación repetida/mantenida de dichas células y pueden considerarse asociadas a una alteración de la respuesta frente a bacterias Gram negativas.

RESPUESTA CELULAR INMUNE ESPECÍFICA AL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) EN PAREJAS HETEROSEXUALES DE PACIENTES INFECTADOS

M.C. Roque Cuéllar^a, B. Sánchez^b, M.A. Álvarez Márquez^b, R. García Lozano^b, M.F. González Escribano^b y J. Aguilar Reina^a

^aSección de Hepatología (Servicio Aparato Digestivo) y ^bServicio de Inmunología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

En algunas series se ha encontrado respuesta inmune celular específica al VHC en parejas y familiares de pacientes con infección aguda o crónica.

Objetivo: Conocer la prevalencia de la respuesta inmune de células T frente al VHC en parejas heterosexuales de pacientes con hepatitis crónica VHC.

Método: Se han incluido 30 parejas heterosexuales, sin anti VHC ni ARN-VHC (TaqMan, tiempo real). Se realizó encuesta sobre riesgos de exposición. Además se estudiaron 15 pacientes en diferentes situaciones respecto al VHC (infección activa, respondedores a tratamiento y aclaramiento espontáneo) y 10 controles sanos. Para la detección de una población funcional de células T memoria que responden a antígenos del VHC solubles, se partió de sangre completa, que se enfrentó a los siguientes 6 péptidos del VHC: 1) NS3 (aa 1241-1260); 2) NS3 (aa 1531-1550); 3) NS3 (aa 1581-1600); 4) NS4b (aa 1771-1790); 5) NS5b (aa 2571-2590); 6) NS5b (aa 2941-2960).

Tras 6 horas de incubación en presencia de moléculas coestimuladoras y BFA, se lisaron los hematíes y se fijaron los leucocitos, para proceder al análisis mediante citometría de flujo, donde se analizaron las siguientes combinaciones: CD69/CD3; CD69/CD4; CD69/CD8; IFN γ -IL-4/CD3; IFN γ -IL-4/CD4; IFN γ -IL-4/CD8. Todos estos datos se analizaron estadísticamente mediante el programa SPSS v 14.0 (H de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney).

Resultados: Se comprobó mayor activación de CD4+ frente al péptido 5) en parejas que en controles ($p < .028$) y mayor porcentaje de células CD4+ que secretan IL-4 + IFN γ frente a los péptidos 1) y 5) ($p < .014$; $p < .031$;) y de CD8+ frente al péptido 1) ($p < .004$). Estos signos de respuesta inmune son significativamente mayores en pacientes que en controles y no hay diferencias entre parejas y parejas.

Conclusiones: Las parejas de pacientes infectados crónicamente por VHC muestran signos de haber entrado en contacto con el virus y de respuesta inmune celular específica a péptidos de VHC.

Sesión general 3

Moderadores: Carmelo García Monzón (Madrid) y Conrado Fernández (Madrid)

TRATAMIENTO DEL PRURITO REFRACTARIO DE LA COLESTASIS MEDIANTE DIÁLISIS CON ALBÚMINA (MARS). ANÁLISIS COMBINADO DE LA EXPERIENCIA DE TRES CENTROS

A. Parés, M. Herrera, J. Avilés y A. Mas

Unidad de Hepatología, Institut de Malalties Digestives, Ciberehd, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona. Servicio de Cuidados Críticos y Urgencias, Complejo Hospitalario Universitario Carlos Haya, Málaga. Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife.

La diálisis con albúmina mediante el sistema MARS es un procedimiento que se ha propuesto para el tratamiento del prurito refractario de las enfermedades colestásicas crónicas. Hasta el momento, se han publicado casos clínicos o series cortas con resultados en general positivos. Sin embargo, es difícil con estas series cortas conocer los efectos reales de este procedimiento. Por este motivo se han analizado conjuntamente los pacientes con prurito tratados con MARS procedentes de 3 hospitales, para conocer los efectos sobre los cambios del prurito, y sobre la colestasis.

Pacientes y métodos: Se han evaluado 19 pacientes (11 mujeres, con una edad media de $51 \pm 4,3$ años) procedentes de tres centros (12, 4 y 3 pacientes) afectados de una enfermedad colestásica crónica (11 casos) o de un rechazo de trasplante hepático (8 casos). En los pacientes se evaluaron antes y después de tratamiento, y al cabo de 30 días, la intensidad del prurito según una escala analógica visual (EAV), y los índices de colestasis que incluyeron bilirrubina total, fosfatasa alcalina, y gamma-glutamyl-transferasa. En 11 pacientes también se analizaron los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos biliares totales. Asimismo se evaluó la duración y el número de sesiones y si el procedimiento se aplicó asociado a diálisis o a hemofiltración.

Resultados: Por cada paciente se realizó un promedio de 2,1 sesiones de MARS totalizando un promedio de 13 horas. La diálisis con albúmina se asoció a una reducción significativa de la intensidad del prurito al finalizar el tratamiento (EAV: de $66,1 \pm 4,9$ a $19,1 \pm 4,3$, $p < 0,001$), aunque volvió a aumentar a los 30 días ($37,3 \pm 7,4$). La EAV del prurito al finalizar el tratamiento disminuyó un 72%, y al cabo de 30 días era del 51% del basal. El prurito disminuyó en todos, excepto en 1 caso (94,7%). El tratamiento se asoció a una disminución significativa de los niveles de ácidos biliares totales tanto al finalizar el tratamiento (reducción del 41 %) como a los 30 días (reducción del 37%). También se observó una disminución significativa de la bilirrubina total y del colesterol, así como de la gamma-glutamyl transferasa. No existieron diferencias significativas en los cambios observados en los pacientes tratados por colestasis crónica o por un rechazo, y tampoco se observaron diferencias respecto a si el MARS se aplicó asociado a diálisis o a hemofiltración. La percepción personal de eficacia del tratamiento se constató como suficientemente positiva en el 75% de los casos. No se registraron efectos adversos graves relacionados con el tratamiento.

Conclusión: Se concluye que el sistema MARS es un procedimiento eficaz para tratar el prurito de los pacientes con enfermedades colestásicas crónicas y en el rechazo de trasplante hepático. El procedimiento se asocia a una disminución de los niveles circulantes de bilirrubina, ácidos biliares y colesterol. No se han podido identificar factores específicos de menor respuesta.

EFFECTOS HEMODINÁMICOS Y SEGURIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN CONTINUADA DE SIMVASTATINA EN PACIENTES CON CIRROSIS E HIPERTENSIÓN PORTAL. ESTUDIO ALEATORIZADO A DOBLE CIEGO CONTROLADO CON PLACEBO

A. Albillos¹, J.G. Abraldes², R. Bañares³, J. Turnes², R. González¹, C. Ripoll³, M. González¹, J.C. García-Pagán² y J. Bosch²

¹Hospital Ramón y Cajal, Universidad de Alcalá, Madrid; ²Hospital Clínic-IDIBAPS, Barcelona; ³Hospital Gregorio Marañón, Madrid y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd).

Las estatinas tienen efectos beneficiosos vasculares en procesos asociados a disfunción endotelial (DE), independientes de la reducción del colesterol. En la cirrosis la existencia de DE intrahepática contribuye a aumentar la resistencia vascular y la presión portal. Estudios previos en ratas cirróticas han demostrado que las estatinas mejoran la DE hepática. Además, en pacientes cirróticos la administración aguda de simvastatina reduce la resistencia vascular hepática. Ello sugiere que la administración de estatinas podría representar una nueva estrategia en el tratamiento de la hipertensión portal.

Objetivo: Evaluar objetivamente los efectos de la administración continuada de simvastatina sobre la presión portal (gradiente de presión venosa hepática, GPVH) y la función hepatocelular en pacientes con cirrosis, así como valorar su seguridad.

Métodos: 59 pacientes con cirrosis e hipertensión portal severa (GPVH ≥ 12 mmHg) fueron aleatorizados a recibir de forma doble ciega simvastatina 20 mg/día (que se aumentó a los 15 días a 40 mg/día) o placebo, durante 1 mes. La aleatorización fue estratificada de acuerdo a si el paciente recibía β -bloqueantes. Se estudiaron la hemodinámica esplácnica y sistémica y variables de función hepática y seguridad, antes y al final del tratamiento.

Resultados: El tratamiento con simvastatina indujo un descenso significativo del GPVH (tabla), sin causar cambios en la hemodinámica sistémica. Esto se asoció a una reducción de la resistencia hepática calculada. El descenso de la presión portal se observó tanto en los pacientes que no recibían β -bloqueantes como en aquellos que sí los recibían. Simvastatina mejoró el aclaramiento hepático y la extracción hepática de verde de indocianina (ICG) sugiriendo que se logró una mejoría en la perfusión hepática efectiva. No se observaron cambios significativos en los pacientes tratados con placebo.

	Placebo			Simvastatina		
	basal	4 s	P	basal	4 s	P
GPVH (mmHg)	20,0 \pm 3,8	19,4 \pm 4,4	0,239	18,8 \pm 7,2	17,3 \pm 4,7	0,0004
Resistencia vascular hepática (UA)	2,07 \pm 0,93	2,17 \pm 0,97	0,463	1,60 \pm 0,79	1,35 \pm 0,58	0,044
CI hepático de ICG (mL min ⁻¹)	237 \pm 148	222 \pm 129	0,436	221 \pm 104	276 \pm 182	0,017
Índice extracción ICG	0,43 \pm 0,20	0,44 \pm 0,19	0,474	0,35 \pm 0,21	0,37 \pm 0,21	0,025

La incidencia de efectos adversos no fue diferente en los dos grupos (21% simvastatina vs 30% placebo). Ningún paciente tuvo que ser retirado del estudio por efectos adversos.

Conclusiones: En pacientes con cirrosis e hipertensión portal la administración continuada de simvastatina redujo significativamente la presión portal. Este efecto se observó también en pacientes que recibían beta-bloqueantes, lo que sugiere un efecto aditivo, y no se acompañó de mayor incidencia de efectos adversos que el placebo.

El potencial de las estatinas para el tratamiento de la hipertensión portal merece ser estudiado en ensayos a largo plazo con *end-points* clínicos.

LA RESISTENCIA A LA INSULINA PROMUEVE LA HEMORRAGIA POR VARICES ESOFÁGICAS

M. Jover^a, L. Grande^a, I. Camacho^b, B. Pardo^a, B. Figueruela^a, A. Madrazo^a, C. Ortiz^a, P. Guerrero^a, E. Suárez^a, JL Larraona^a y M. Romero-Gómez^a

^aUnidad de Gestión Clínica de Enfermedades Digestivas y CIBEREHD. Hospital Universitario de Valme, Sevilla; ^bServicio de Bioquímica. Hospital Universitario de Valme. Sevilla.

Introducción: La resistencia a la insulina es el principal evento del síndrome metabólico. La hiperinsulinemia detectada en esta situación es responsable del desarrollo de daño endotelial en cerebro, retina, corazón y riñones. La resistencia a la insulina está presente en más de la mitad de los pacientes con cirrosis hepática.

Objetivo: Estudiar la influencia de la resistencia a la insulina en el riesgo de desarrollar hemorragia por varices esofágicas en pacientes con cirrosis hepática compensada.

Pacientes y métodos: Incluimos 118 pacientes consecutivos con cirrosis hepática [85 hombres (72%) y 33 mujeres (28%), con edad media de 58±10 años, etiología alcohólica 59 (50%), virus C 35 (30,5%), virus B 10 (8,5%) y otros 14 (11%)]. En el momento de la inclusión se recogió el tamaño de las varices valorado por endoscopia según la clasificación de NIEC (F0 = 28; F1 = 36; F2 = 31 y F3 = 13), la función hepática (Child-Pugh: 6,3±1,5; MELD: 9,95±4,9 puntos), óxido nítrico y receptor soluble 2 del TNF (ELISA, kit R&D System, Minneapolis, Mi). Realizamos la prueba de la sobrecarga oral de glutamina (SOG) y medimos la producción intestinal de amonio (método enzimático GDH, COBAS Integra, ROCHE). Medimos la insulinemia (ECLIA), resistencia a la insulina mediante HOMA = Insulina (mUI/ml) * glucosa (mmol/L) / 22,5 y glucagonemia mediante RIA. Los pacientes se siguieron en consulta cada 6 meses (seguimiento medio de 23,7±13,9 meses) hasta el fallecimiento, trasplante o el desarrollo de complicaciones mayores de la cirrosis.

Resultados: Durante el seguimiento presentaron hemorragia por varices (HVE) 44 pacientes (37,3%). En el análisis univariado se demostró que la HVE se relacionó con la producción intestinal de amonio (AUC SOG), el índice HOMA, el tamaño de las varices, la edad, la glucagonemia, y el MELD. Un HOMA > 4 se asoció a mayor riesgo de HVE (Kaplan-Meier: 9,02; p < 0,002), el riesgo de HVE al primer año fue del 28% en el grupo con HOMA > 4 frente al 8% en el grupo de cirróticos con HOMA < 4. En la regresión de COX Backward LR, las variables independientes predictoras de HVE fueron: la glucagonemia (p = 0,02), la puntuación de Child-Pugh (p = 0,04), el tamaño de las varices esofágicas (p = 0,01) y el índice HOMA (p = 0,003).

Conclusiones: La resistencia a la insulina está estrechamente ligada al riesgo de desarrollar hemorragia por varices esofágicas, junto a la hiper glucagonemia, el tamaño de las varices y la disfunción hepática. Los pacientes con HOMA > 4 presentan un mayor riesgo de HVE y deberían monitorizarse de forma estrecha. El tratamiento de la resistencia a la insulina podría ser una nueva diana terapéutica en la profilaxis de la hemorragia por varices.

Agradecimientos: P1040384 y CIBER CB06/04/0047 del ISCIII.

UN NUEVO ÍNDICE QUE PERMITE LA ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA DE PACIENTES CON HEPATITIS ALCOHÓLICA

M. Domínguez^a, D. Rincón^b, J.G. Abrales^a, R. Miquel^c, J. Colmenero^a, P. Bellot^a, J.C. García-Pagán^a, R. Fernández^a, M. Moreno^a, R. Bañares^b, V. Arroyo^a, J. Caballería^a, P. Ginès^a y R. Bataller^a

^aUnidad de Hepatología, Institut Clínic Malalties Digestives i Metabòliques y ^cUnidad de Patología, Hospital Clínic. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD) y Centro de Investigación Biomédica Esther Koplowitz (CIBEK), Barcelona.

^bUnidad de Hepatología, División de Gastroenterología y Hepatología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Introducción y objetivo: La hepatitis alcohólica (HA) forma parte del espectro de la enfermedad hepática alcohólica. En sus formas graves, la HA se asocia a una elevada mortalidad a corto plazo. El pronóstico de estos pacientes ha sido evaluado utilizando la función discriminante de Maddrey. Sin embargo, este índice no predice exactamente la gravedad de la HA, por lo que es necesario el desarrollo de nuevos sistemas pronósticos que permitan estratificar estos pacientes, para mejorar el manejo clínico de la enfermedad y facilitar la realización de ensayos clínicos. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el valor combinado de parámetros clínicos, analíticos, histológicos y hemodinámicos hepáticos en pacientes con HA para generar un nuevo sistema de estratificación pronóstica de acuerdo al riesgo de muerte a 90 días y al año.

Métodos: Se incluyó prospectivamente pacientes con HA con confirmación histológica, admitidos en la Unidad de Hepatología del Hospital Clínic de Barcelona, durante el período 2000-2006. Se evaluó parámetros clínicos, analíticos, histológicos y hemodinámicos hepáticos como predictores de mortalidad a 90 días y a 1 año. Se utilizó el modelo de regresión de Cox para el análisis uni y multivariado. Las variables identificadas en el análisis multivariado como predictoras independientes de mortalidad fueron utilizadas para crear el nuevo índice predictivo de mortalidad. Los resultados fueron validados en una cohorte independiente procedente de la Unidad de Hepatología del Hospital Gregorio Marañón (n = 80).

Resultados: Se incluyó 103 pacientes con HA confirmada histológicamente. El análisis multivariado identificó 4 variables independientemente predictoras de mortalidad a 90 días (edad, bilirrubina, creatinina sérica e INR). Con estas variables se generó el *ABIC score*: (edad x 0,1) + (bilirrubina en mg/dl x 0,08) + (creatinina en mg/dl x 0,3) + (INR x 0,8). El área bajo la curva del *ABIC score* fue de 0,82 con mejor exactitud pronóstica que el Índice de Maddrey (0,70; p < 0,05). Utilizando valores de cut-off de 6,71 y 9, el análisis de Kaplan-Meier identificó pacientes con riesgo bajo, intermedio y alto de muerte a 90 días (100%, 70% y 22% de supervivencia, respectivamente). Estos mismos valores de cut-off también permitieron estratificar a los pacientes de acuerdo al riesgo de muerte al año. Estos resultados fueron confirmados en una cohorte de validación.

Conclusiones: El *ABIC score* permite la estratificación de pacientes con HA respecto a su riesgo de muerte a 90 días y al año. Este índice puede ayudar a mejorar el manejo clínico de estos pacientes y a diseñar nuevos ensayos clínicos.

OBESIDAD MÓRBIDA: IMPORTANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO (EO) Y LAS CITOQUINAS EN LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICA (EHGNA) Y SU COMPORTAMIENTO DESPUÉS DE LA PÉRDIDA DE PESO

J. León^a, A. Gila^a, J. Casado^a, A. Carazo^a, S. Delgado^b, T. Caballero^c, D. Quintero^a, A. Martín^a, A. García Robles^b, P. Muñoz^a, A. Ruiz Extremera^d y J. Salmerón^a

Unidad Clínica y de Investigación de Aparato Digestivo^a, Cirugía B^b, Anatomía Patológica^c y Pediatría^d. Hospital Universitario San Cecilio. Granada. CIBERehd.

Introducción: El EHGNA es una entidad que incluye la esteatosis hepática sin inflamación, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)

y la cirrosis hepática. Aunque la patogenia de la enfermedad no está clara, la hipótesis más aceptada es la teoría del doble impacto: primer impacto, una acumulación intrahepática de grasa que induce resistencia a la insulina (RI) y segundo impacto, el EO. Este último, a su vez, induce mayor producción de radicales libres y de citoquinas proinflamatorias, lo que finalmente da lugar a fibrosis y muerte celular.

Objetivos: 1) Estudiar los diferentes marcadores de EO y citoquinas en la obesidad mórbida y relacionarlo con los diferentes grados de lesión hepática. 2) Investigar si los obesos con resistencia a la insulina tienen mayor grado de estrés oxidativo. 3) Estudiar si las alteraciones mejoran o desaparecen con la pérdida de peso.

Métodos: Estudio prospectivo de 52 pacientes obesos mórbidos biopsiados en el transcurso de la cirugía. Las biopsias fueron estudiadas por un mismo anatomopatólogo y clasificadas según el nuevo score (Kleiner). Se tomaron muestras de sangre venosa para la determinación de los parámetros bioquímicos, RI (HOMA), marcadores de estrés oxidativo y citoquinas. En 13 pacientes se realizó un seguimiento y a los 12 meses después de la cirugía una nueva determinación de los parámetros bioquímicos, RI y EO.

Resultados: De los 52 pacientes, el 71% eran mujeres y el 29% hombres. La media de edad fue de 42 ± 11 y el IMC de 51 ± 7 . El 67% (n = 35) de los pacientes presentó esteatosis, el 15% (n = 8) fibrosis y el 15% (n = 8) EHNA. Los pacientes con esteatosis y EHNA tenían mayores niveles de ALT (P < 0,001) y AST (P < 0,001). No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los parámetros de EO o los niveles de citoquinas plasmáticas con los diferentes grados de fibrosis. Los pacientes con esteatosis presentaron mayores niveles de LPO (9 ± 2 vs 7 ± 2 nmol/ml, P = 0,014). Los pacientes con EHNA tenían mayor LPO ($8,3 \pm 0,4$ vs $5,8 \pm 0,8$, P = 0,02) y mayores niveles de leptina ($29,4 \pm 1,9$ vs $15,1 \pm 6,2$, P = 0,032). La RI (HOMA $\geq 2,5$) se relacionó con IL-6 (P = 0,055), MCP-1 (P = 0,021) y altos niveles de LPO (P = 0,044). El aumento de ALT (> 40 U/l) se correlacionó con niveles también altos de leptina (P = 0,02) y de GSSG (P = 0,051), como en la EHNA. Un año después de la cirugía las alteraciones encontradas habían mejorado ostensiblemente y los pacientes presentaban disminución de ALT (P = 0,005) y GGT (P = 0,028), menor índice HOMA (P = 0,068) y una mejoría evidente de los marcadores de EO (LPO, P = 0,002; GPx, P = 0,075 y GSSG, P = 0,06).

Conclusiones: La LPO y la leptina se pueden considerar marcadores de esteatohepatitis, mientras que la LPO se podría usar como marcador de esteatosis. El aumento de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y MCP-1 podría ser responsable de la RI, lo que daría lugar a un aumento de EO. Por último, la pérdida de peso conduce a una mejoría de la RI, el EO y el daño hepático.

LA RESTAURACIÓN DE COENZIMA Q POR N-ACETILCISTEÍNA PREVIENE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y MUERTE CELULAR EN HEPATOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

R. González^a, I. Ranchal^a, G. Ferrín^a, A.B. Hidalgo¹, P. López-Cillero^b, G. Costán^a, A. Bernardos^c, G. López-Lluch^d, M. Santos-González^e, J. Briceño^b, Rufián^b, J.M. Villalba^e, P. Navas^d, M. de la Mata^a y J. Muntané^a

^aLiver Research Unit y ^bCirugía, Hospital Reina Sofía, Córdoba.

^cUnidad Cirugía HBP-THO. Hospital Virgen del Rocío, Sevilla. ^dCABD, Universidad Pablo Olavide, Sevilla. ^eDpt. Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Córdoba.

Introducción: La N-acetilcisteína reduce el estrés oxidativo y muerte celular en diversos modelos experimentales. La muerte celular por D-galactosamina (D-GalN) se relaciona con disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en hepatocitos.

Objetivos: El estudio investiga los mecanismos intracelulares de prevención por NAC de la muerte celular en hepatocitos.

Material y métodos: Los hepatocitos se aislaron de biopsias hepáticas obtenidas de pacientes sometidos a resección hepática. NAC (0,5 mM) se co-administró con D-GalN (40 mM) en hepatocitos hu-

manos en cultivo. Se determinaron parámetros de apoptosis y necrosis celular, la actividad de los complejos mitocondriales, coenzima Q (Q) (oxidado/reducido), potencial mitocondrial y producción de radicales libres, ATP y GSH mitocondrial.

Resultados: La muerte celular por D-GalN se asoció con la oxidación de Q, reducción de la actividad de los complejos I+III y II+III mitocondriales, estrés oxidativo, despolarización de la membrana mitocondrial, y depleción de ATP y GSH. La recuperación de GSH y disminución de la producción de radicales libres en mitocondria por NAC se relacionó con la prevención de la oxidación de Q y la restauración de la actividad mitocondrial y del contenido de ATP, así como la prevención de la muerte celular inducida por D-GalN en hepatocitos humanos en cultivo. La suplementación con Q₁₀ ejerció los mismos efectos beneficiosos que NAC sobre la disfunción mitocondrial y muerte celular por D-GalN.

Conclusión: 1) La depleción en Q mitocondrial es clave en la disfunción mitocondrial y muerte celular por D-GalN. 2) El efecto beneficioso de NAC se relaciona con la prevención de la oxidación de Q, estabilización de la función mitocondrial y prevención de muerte celular.

LA ASOCIACIÓN DE NORFLOXACINO Y CEFOTAXIMA EN PACIENTES CON PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA REDUCE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO FRENTE A PACIENTES TRATADOS CON CEFOTAXIMA

P. Bellot¹, R. Francés^{1,5}, P. Zapater^{3,5}, C. Guarner-Argente², E. Román², R. Caño¹, C. Guarner^{2,5}, L. Llanos, G. Soriano^{2,5}, C. Muñoz², C. Guarner^{2,5}, M. Pérez-Mateo¹ y J. Such^{1,5}

¹Unidad Hepática, ²Servicio de Farmacología Clínica, ³Sección de Inmunología, Hospital General Universitario de Alicante. ⁴Servicio de Patología Digestiva, Hospital de la Sta. Creu i St. Pau, Barcelona.

⁵CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

La peritonitis bacteriana espontánea (PBE) en pacientes con cirrosis induce una marcada respuesta proinflamatoria y de liberación de óxido nítrico (ON) que tiene consecuencias pronósticas y que no cesa tras el inicio de tratamiento antibiótico. En trabajos previos hemos comprobado que este hecho se asocia al mantenimiento de fenómenos de traslocación de fragmentos genómicos bacterianos (ADNbact) en los primeros días tras el inicio del tratamiento.

Objetivo: Comprobar si la asociación de norfloxacin a la cefotaxima en pacientes con PBE impide la traslocación de ADNbact y reduce la liberación de ON.

Pacientes y métodos: Hemos estudiado un grupo de pacientes con PBE que han sido tratados con dos diferentes modalidades terapéuticas. Grupo I (n = 6) recibieron cefotaxima 2 g/12 h tras la cual se inició descontaminación intestinal selectiva (DIS) con norfloxacin, y Grupo II (n = 5) en los que se había hecho coincidir el inicio de DIS con el de tratamiento del episodio de PBE (norfloxacin 400 mg/12 h durante el tiempo de tratamiento de PBE). Se obtuvo la muestra de ascitis y sangre basal en todos los casos y muestras de sangre cada 24 h durante 96 horas. En las muestras se ha estudiado la presencia de ADNbact y los niveles plasmáticos de ON e IL-12.

Resultados: La asociación de norfloxacin se asocia a la desaparición del ADNbact en el 75% de los casos estudiados, frente al 0% de los pacientes tratados con cefotaxima (p < 0,05) a partir de las 24 horas de inicio del tratamiento. Esta diferencia se mantiene hasta las 120 h de tratamiento. La ausencia de ADNbact se asocia a un descenso significativo de las cifras de ON ($35,8 \pm 5,1$ vs $27,1 \pm 5,3$ nmol/mL, p = 0,02) e IL-12 séricas ($471,5 \pm 45,6$ vs $352,4 \pm 24,5$ pg/mL, p = 0,014).

Conclusiones: El adelanto de aplicación de profilaxis secundaria de PBE al momento del inicio del tratamiento antibiótico habitual reduce la incidencia de traslocación de ADNbact y los niveles de ON e IL-12. Estos resultados justifican el diseño de un ensayo clínico para explorar el efecto de este procedimiento terapéutico sobre el desarrollo de insuficiencia renal y muerte en pacientes con PBE.

Sesión general 4

Moderadores: Jesús Prieto (Pamplona) y Jordi Muntané (Córdoba)

INDICADORES DE RECIDIVA HEMORRÁGICA EN PACIENTES SIN RESPUESTA HEMODINÁMICA AL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN PORTAL

A. Colomo^{a,b}, C. Aracil^a, V. Hernández-Gea^{a,b}, C. Álvarez-Urrutia^{a,b}, Gordillo^{a,b}, I. Ordas^a, C. Guarner^{a,b}, C. Villanueva^{a,b} y J. Balanzo^{a,b}

^aUnitat Sagnant, Servicio Patología Digestiva. Hospital Sant Pau. Barcelona. ^bUnitat Sagnant, Servicio Patología Digestiva. Hospital Sant Pau. Barcelona. ^cCIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

La respuesta hemodinámica al tratamiento de la hipertensión portal se considera adecuada cuando el gradiente de presión de las venas suprahepáticas (GPSH) desciende a ≤ 12 mmHg o $> 20\%$ respecto al valor basal. Los respondedores hemodinámicos tienen un bajo riesgo de hemorragia varicosa y mejor supervivencia que los no-respondedores. Los pacientes no-respondedores podrían beneficiarse de tratamientos de rescate, particularmente en la profilaxis secundaria donde el riesgo de hemorragia es mucho más elevado. Sin embargo, hasta un 40%-50% de no-respondedores no presentan recidiva hemorrágica. El objetivo de este estudio consistió en determinar los factores predictivos de recidiva hemorrágica varicosa en los pacientes sin respuesta hemodinámica al tratamiento de primera línea.

Métodos: Se incluyeron 400 pacientes que tras un episodio agudo de hemorragia varicosa recibieron tratamiento electivo con fármacos (β -bloqueantes \pm nitratos), con ligadura endoscópica, o con ambos para prevenir recidivas hemorrágicas. Se efectuó un estudio hemodinámico basal en 344 pacientes y un segundo estudio 1-3 meses después en 302 para evaluar la respuesta que se definió como un descenso del GPSH a ≤ 12 mmHg o $\geq 20\%$.

Se incluyeron 400 pacientes que tras un episodio agudo de hemorragia varicosa recibieron tratamiento electivo con fármacos (β -bloqueantes \pm nitratos), con ligadura endoscópica, o con ambos para prevenir recidivas hemorrágicas. Se efectuó un estudio hemodinámico basal en 344 pacientes y un segundo estudio 1-3 meses después en 302 para evaluar la respuesta que se definió como un descenso del GPSH a 12 mmHg o 20%.

Resultados: Un 48% de los incluidos tenían una cirrosis de etiología alcohólica, un 81% eran Child-Pugh B/C basal y un 49% lo eran al 3r mes de seguimiento. 114 pacientes (38%) fueron respondedores hemodinámicos y 188 (62%) fueron no-respondedores. Durante un seguimiento medio de 43 ± 40 meses, 148 pacientes (37%) recidivaron y 207 (52%) fallecieron. Recidivaron un 16% de respondedores y un 48% de no-respondedores ($P < 0,001$) y fallecieron un 32% vs 52% respectivamente ($P = 0,001$). Entre los no-respondedores hemodinámicos, aquellos que redivaron tuvieron en comparación con los que no recidivaron, mayor bilirrubina ($P = 0,01$) y plaquetas ($P = 0,01$) en condiciones basales y mayor Child-Pugh ($P < 0,01$) al 3r mes de seguimiento, un mayor GPSH en el estudio control ($P = 0,05$) y una menor tasa de descenso del GPSH $> 10\%$ del basal ($P = 0,01$), así como un mayor índice de fracaso en el control de la hemorragia aguda ($P < 0,01$) y mayor edad ($P = 0,01$). En el análisis multivariado incluyendo estos parámetros, el descenso del GPSH $< 10\%$ del basal (OR = 1,6, IC 95% CI = 1,1-2,6), un peor Child-Pugh al 3r mes (OR = 1,2, IC 95% CI = 1,1-1,3) y el fracaso en el control de la hemorragia aguda (OR = 1,6, IC 95% CI = 1,1-2,6), fueron pre-

dictores independientes de recidiva hemorrágica entre los no-respondedores.

Un 48% de los incluidos tenían una cirrosis de etiología alcohólica, un 81% eran Child-Pugh B/C basal y un 49% lo eran al 3r mes de seguimiento. 114 pacientes (38%) fueron respondedores hemodinámicos y 188 (62%) fueron no-respondedores. Durante un seguimiento medio de 43 40 meses, 148 pacientes (37%) recidivaron y 207 (52%) fallecieron. Recidivaron un 16% de respondedores y un 48% de no-respondedores ($P < 0,001$) y fallecieron un 32% vs 52% respectivamente ($P = 0,001$). Entre los no-respondedores hemodinámicos, aquellos que redivaron tuvieron en comparación con los que no recidivaron, mayor bilirrubina ($P = 0,01$) y plaquetas ($P = 0,01$) en condiciones basales y mayor Child-Pugh ($P < 0,01$) al 3r mes de seguimiento, un mayor GPSH en el estudio control ($P = 0,05$) y una menor tasa de descenso del GPSH $> 10\%$ del basal ($P = 0,01$), así como un mayor índice de fracaso en el control de la hemorragia aguda ($P < 0,01$) y mayor edad ($P = 0,01$). En el análisis multivariado incluyendo estos parámetros, el descenso del GPSH $< 10\%$ del basal (OR = 1,6, IC 95% CI = 1,1-2,6), un peor Child-Pugh al 3 mes (OR = 1,2, IC 95% CI = 1,1-1,3) y el fracaso en el control de la hemorragia aguda (OR = 1,6, IC 95% CI = 1,1-2,6), fueron predictores independientes de recidiva hemorrágica entre los no-respondedores.

Conclusiones: En pacientes sin respuesta hemodinámica al tratamiento para la prevención de recidiva hemorrágica varicosa, un descenso del GPSH $< 10\%$ del basal, un peor Child-Pugh al 3r mes de seguimiento y el fracaso en el control de la hemorragia aguda son indicadores independientes de riesgo de recidiva. La consideración de estos factores puede mejorar la indicación de un tratamiento de rescate en pacientes sin respuesta hemodinámica.

En pacientes sin respuesta hemodinámica al tratamiento para la prevención de recidiva hemorrágica varicosa, un descenso del GPSH $< 10\%$ del basal, un peor Child-Pugh al 3 mes de seguimiento y el fracaso en el control de la hemorragia aguda son indicadores independientes de riesgo de recidiva. La consideración de estos factores puede mejorar la indicación de un tratamiento de rescate en pacientes sin respuesta hemodinámica.

TRASPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL A RATAS CON HEPATITIS EXPERIMENTAL

A.I. Álvarez-Mercado^a, S. Sánchez-Campos^b, M.V. García-Mediavilla^b, F. Abadía^c, M.J. Sáez-Lara^d, M. Cabello-Donayre^a, A. Gil^a, J. González-Gallego^b y L. Fontana^a

^aDepto. Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. ^bCiberehd e Instituto de Biomedicina, Universidad de León. ^cDepartamento Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.

Antecedentes y objetivos: La sangre de cordón es fuente de células progenitoras y representa una alternativa a la médula ósea. El objetivo de este trabajo fue investigar si la población de células mononucleares procedentes de sangre humana de cordón umbilical (HUCBM) podría tener utilidad en medicina regenerativa hepática.

Métodos: Se investigó el potencial regenerativo de las HUCBM mediante experimentos de xenotrasplante a ratas con hepatitis experimental producida por inyección i.p. de D-galactosamina (D-Gal)

en dosis 250 mg/kg. Las HUCBM (2×10^6) se inyectaron a través de la vena porta. Los animales fueron sometidos a inmunosupresión. Se sacrificaron animales a las 24, 48 y 72 horas posteriores al trasplante, obteniéndose muestras de sangre e hígado. La evaluación histológica de los hígados se realizó en secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. La presencia de HUCBM en los hígados se investigó por microscopía confocal, citometría de flujo y western blot. Para evaluar el efecto de la terapia celular se determinaron marcadores plasmáticos de daño hepático.

Resultados: El tratamiento con D-Gal produjo un daño hepático severo. Se detectaron HUCBM en sangre y en hígado, tanto en ratas con hepatitis experimental como en controles. El trasplante celular produjo una mejora de la función hepática, tal como revelaron los valores plasmáticos de fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transferasa, lactato deshidrogenasa, y bilirrubinas total y directa, que siempre fueron más cercanos a los valores de ratas sanas en el grupo de animales con hepatitis que recibieron HUCBM en comparación con los que no lo recibieron.

Conclusiones: Los resultados sugieren que las HUCBM son capaces de establecerse en el hígado en este modelo de xenotrasplante, y pueden considerarse una fuente celular idónea para la terapia de la enfermedad hepática.

Financiado con proyectos P1050520 del FIS y P06-CTS1365 de la Junta de Andalucía (LF); UXXI2006/0002 de la Federación de Cajas de Ahorro de Castilla y León (JGG); y SAN196/LE04/07 de la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León (SSC).

PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL DAÑO HEPÁTICO AGUDO EXPERIMENTAL CON CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES

V. Fernández-Ruiz, M.P. Kawa, M. Iñiguez, C. Berasain, C. Qian y J. Prieto

División de Hepatología y Terapia Génica. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra, Pamplona, España.

Introducción y objetivos: El endotelio vascular juega un papel relevante en la regulación de la homeostasis tisular y en la prevención del daño tisular mediante un mecanismo independiente del proceso de angiogénesis. En el presente trabajo se analizó la capacidad de las EPC para producir factores citoprotectores y se valoró el potencial de estas células para la prevención y tratamiento del daño hepático mediado por citoquinas proinflamatorias. Como modelos experimentales se utilizaron la hepatitis inducida por concanavalina A (ConA) y el fallo hepático provocado por la administración de un adenovirus codificante de CD40 ligando (Ad-CD40L). Este vector infecta las células hepáticas induciendo una activación de mecanismos inmunes causantes de un daño hepático que remedia la hepatitis fulminante.

Métodos: Las EPC de ratón se obtuvieron mediante el aislamiento de las células mononucleares de médula ósea y su posterior cultivo durante 7 días en presencia de un medio selectivo para la diferenciación a endotelio. Se analizaron por qPCR y ELISA la producción in vitro por las EPC de factores hepatoprotectores VEGF, HGF, IGF-I y CT-1 y del factor quimiotáctico para células progenitoras SDF-1. En los experimentos in vivo se trataron a ratones C57BL/6 con inyección intravenosa de ConA a 12 mg/Kg o de 10^{10} pfu/ratón del Ad-CD40L. El tratamiento se realizó con 2×10^6 EPC antes (prevención) o después de la inducción del daño (tratamiento). Se estudió la tasa de supervivencia, los niveles séricos de transaminasas y los parámetros histológicos de daño.

Resultados: Se observó que las EPC producen in vitro cantidades abundantes de VEGF, HGF, IGF-I y SDF-1. La administración de EPC una hora antes, o 3 horas después de la inducción del daño hepático por ConA, provocó un descenso significativo de los niveles de transaminasas, una reducción del número de núcleos apoptóticos y una importante disminución de las áreas de necrosis hepatocelular. En el modelo de hepatitis fulminante por Ad-CD40L, todos los animales sin tratamiento murieron a partir de las 120h tras la administración del vector. La tasa de supervivencia de los animales con daño hepático tras la administración intravenosa de EPC a las 24, 48 ó 72 horas después de la inyección del Ad-CD40L fue del 17%,

50% y 67%, respectivamente. El tratamiento con dos dosis consecutivas de EPC, administradas por vía intravenosa a las 48 y 72 horas, resultó en una supervivencia del 100%.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran que las EPC derivadas de la médula ósea son fuente importante de moléculas hepatoprotectoras y de factores quimiotácticos capaces de atraer más células progenitoras endoteliales al lugar de la lesión. La administración de EPC es eficaz en la prevención y tratamiento del daño hepático agudo causado por citoquinas inflamatorias permitiendo una supervivencia del 100% en modelos letales de hepatitis fulminante. Estas observaciones apoyan el uso de esta terapia celular en pacientes con daño hepático agudo severo.

EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN WILMS' TUMOR 1 (WT1) EN EL HEPATOCARCINOMA HUMANO

M.J. Perugorría, J. Castillo, M.U. Latasa, V. Segura, S. Goñi, H. Cartagena, E. Petri, B. Sangro, J. Prieto, M.A. Avila y C. Berasain.

División de Hepatología y Terapia Génica. CIMA. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.

Introducción: El factor de transcripción *Wilms' tumor 1* (WT1) se expresa en el hígado fetal, pero su expresión en el hígado adulto es indetectable. En un trabajo previo nuestro grupo demostró que la expresión de WT1 en el hígado se induce significativamente en las hepatitis crónicas y las cirrosis, correlacionándose de forma inversa con la función hepática. Además, en hepatocitos de rata en cultivo primario la expresión de WT1 resultó en la inducción de genes característicos del hígado fetal y en la inhibición de la expresión de marcadores de diferenciación del hepatocito. Por todo ello, WT1 puede jugar un papel en la progresión de la enfermedad y en la insuficiencia hepática. El carcinoma hepatocelular (HCC) normalmente se desarrolla sobre un hígado con daño crónico, y a pesar de su heterogeneidad molecular, un rasgo común es la inhibición de la expresión de genes hígado-específicos.

Objetivo: Estudiar la expresión y función de WT1 en el HCC humano.

Pacientes y métodos: La expresión de WT1 se estudió por RT-PCR a tiempo real en muestras de hígado obtenidas de pacientes con cambios mínimos (controles), en muestras de HCC humanas y en 5 líneas celulares de HCC humano. Utilizando el microarray HGU133-Plus de Affymetrix se comparó el perfil de expresión génica de la línea de hepatoma PLC tras el silenciamiento de la expresión de WT1 mediante siRNA específicos. Mediante un ELISA de apoptosis y la detección por western blot del fragmento activo de la caspasa 3, se analizó el efecto del silenciamiento de la expresión de WT1 en la sensibilidad a la apoptosis inducida por el TGFbeta y la doxorubicina en la línea de hepatoma PLC.

Resultados: El 60% de los HCC mostraron niveles de mRNA de WT1 superiores a los hígados control. La expresión de WT1 se detectó en 3 de las 5 líneas de HCC analizadas. El silenciamiento de la expresión de WT1 en la línea PLC resultó en la inducción de la expresión de 251 genes, muchos de ellos implicados en procesos fisiológicos y en metabolismo. Algunos de estos genes, verificados por RT-PCR en diferentes ensayos, son marcadores hepáticos. Este es el caso del factor de transcripción HNF4, la albúmina, la transtiretina (TTR) o la ácido biliar-coenzima A amino ácido N-aciltransferasa (BAAT). El silenciamiento de la expresión de WT1 también dio lugar a la inhibición de 321 transcritos, muchos de ellos implicados en transformación neoplásica y supervivencia. Entre los genes verificados por RT-PCR se encuentran los genes anti-apoptóticos Bclw y Bclx. El silenciamiento de la expresión de WT1 en las células PLC sensibilizó significativamente a estas células a la apoptosis inducida por TGFbeta y doxorubicina.

Conclusiones: Un número significativo de HCC expresan elevados niveles de WT1. La expresión de WT1 contribuye a la supervivencia y desdiferenciación de las células de HCC. La inhibición de la expresión o función de WT1 puede representar una nueva estrategia terapéutica en un grupo de pacientes con HCC.

EFFECTO DE LA RESPUESTA VIROLÓGICA SOSTENIDA AL TRATAMIENTO CON PEGINTERFERÓN Y RIBAVIRINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTOS EN LA CIRROSIS POR VHC

S. Alonso^a, R. Temiño^a, M.L. Gutiérrez^a, C. Fernández Rodríguez^a, G. Rodríguez Caravaca^a, M.A. Serra^b, F. Rodríguez^b, R. Bárcena^c, S. Del Campo^c, J.R. Erdozain^d, G. Carrión^d, I. Fernández^e, G. Castellanos^e, M. Romero-Gómez^f, A. Madrazo^f, J. Fuente^g, R. Solá^h, J. Avilésⁱ, A. Poyato^j, M. de la Mata^j, F. Gea^k, J.R. Larrubia^l, M. Gómez-Rubio^m y B. de Cuenca^m

Fundación Hospital Alcorcón^a, Madrid; H. Clínico Univ de Valencia^b; Hospital Ramón y Cajal^c, Madrid; HU La Paz, Madrid^d; HU 12 de Octubre, Madrid^e; Hospital de Valme^f, Sevilla; H. Miguel Server^g, Zaragoza; Hospital del Mar^h, Barcelona; HU Tenerifeⁱ; HU Reina Sofía, Córdoba; Hospital de Leganés^k, HU de Guadalajara^l; 13-HU de Getafe, Madrid^m.

Introducción: Los pacientes con cirrosis por el virus de la hepatitis C representan una población de alto riesgo de sufrir descompensación o hepatocarcinoma, a la vez que conforman un subgrupo de respuesta subóptima al tratamiento antiviral. Existe escasa información sobre el efecto de la respuesta virológica sostenida (RVS) en la evolución de esta población y los factores predictores de respuesta antiviral.

Objetivos: 1) Conocer el efecto de la RVS en pacientes con cirrosis por VHC sobre la supervivencia libre de eventos (descompensación y hepatocarcinoma) y 2) Determinar los factores que predicen la respuesta antiviral.

Métodos: Análisis retrospectivo multicéntrico de pacientes con cirrosis por VHC registrados en las bases de datos actualizadas de 13 hospitales, tratados con peginterferón y ribavirina desde el año 2001 hasta la actualidad. Se presentan datos de 272 pacientes. Se consideró RVS cuando el ARN-VHC sérico fue indetectable a las 24 semanas de finalizado el tratamiento (< 50 UI/ml). Los factores predictores independientes de eventos y RVS se analizaron mediante análisis de regresión logística y la probabilidad de supervivencia libre de eventos mediante curvas de Kaplan-Meier y la prueba de log rank.

Resultados: La tasa de RVS fue de 26,1% sin diferencia entre centros. La mediana de seguimiento fue de 32 meses. La RVS y la albúmina basal superior a 3,95 g/dl fueron factores predictivos independientes de permanecer libre de eventos durante el seguimiento (OR = 0,074; IC 0,009-0,577 y OR = 0,155; IC 0,054-0,451, respectivamente). La probabilidad de supervivencia libre de eventos a los 5 años fue del 57% en los pacientes no respondedores frente al 95% en los que alcanzaron RVS (p = 0,007) y del 55% frente al 84,3% en los pacientes con albúmina basal superior o inferior a 3,95 g/dl, respectivamente (p < 0,01). Los factores predictivos de RVS fueron el genotipo no 1 (OR = 4,15; IC 95% 1,72-9,99), la dosis total y tiempo del tratamiento superior al 80% (OR = 3,84; IC 95% 1,71-8,5), cifras de GGT inferior a 80 UI/ml (OR = 5,87; IC 95% 2,5-13,6) y una carga viral basal inferior a 1,2.10⁶ (OR = 3,6; IC 95% 1,59-1,81). El valor predictivo negativo (VPN) del descenso de < 2 log en la carga viral basal en la semana 4 de tratamiento fue del 95,7%.

Conclusiones: La respuesta virológica sostenida previene las complicaciones de la cirrosis aunque la albuminemia inferior a 3,95 g/dl identifica un subgrupo de pacientes con peor pronóstico independientemente de la RVS. Los datos de cinética viral precoz permiten identificar un subgrupo con muy escasa posibilidad de respuesta.

AQUAPORINA-1 Y RETENCIÓN ACUOSA EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

E. Fábrega^a, A. Berja^b, M.T. García-Unzueta^c, M. Cobo^a, M. López^a, J.A. Amado^b y F. Pons Romero^a

^aServicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. ^bServicio de Endocrinología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. ^cServicio de Bioquímica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

Las aquaporinas son una familia de proteínas intrínsecas de membrana que juegan un papel esencial en el mantenimiento del balance

hídrico al encargarse de la reabsorción tubular del agua. Hasta el momento se han identificado 10 aquaporinas. Entre ellas destacan la aquaporina-1 (AQ-1) que participa en la reabsorción de agua en el túbulo proximal y la aquaporina-2 (AQ-2) que actúa en los túbulos colectores. La cirrosis hepática se asocia a un trastorno en la regulación del balance de agua que en fases más evolucionadas puede producir junto con la retención de sal, un exceso en la retención de agua libre, que conduce a la dilución del fluido extracelular y la aparición de hiponatremia. La intensidad de este trastorno varía de un paciente a otro. El objetivo de nuestro estudio ha sido analizar la expresión de diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de la AQ-1: rs1049305 (C/G, UTR3); y de la AQ-2: (rs3741559 (A/G, intrónico) y el rs467323 (C/T, UTR3) en pacientes cirróticos con ascitis y su relación con las alteraciones hidroelectrolíticas.

Material y métodos: Se analizaron los SNPs previamente descritos de la AQ-1 y AQ-2 en 47 pacientes con cirrosis hepática y descompensación ascítica. Además de los análisis bioquímicos correspondientes se extrajo DNA de cada individuo para el análisis polimórfico, utilizando el kit Qiagen (Hilden, Germany). Para el estudio de genotipado de los diferentes polimorfismos se utilizaron ensayos Custom Taqman[®] SNP Genotyping assays validados (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK). Tras la amplificación del DNA la identificación alélica se realizó en un detector ABI 7300 (Applied Biosystems).

Resultados: Las frecuencias genotípicas obtenidas para el SNP de la AQ-1 fueron las siguientes: a) 14,8% genotipo C/C (no mutado); b) 48,9% genotipo C/G (heterocigoto); y c) 36,1% genotipo G/G (mutado). Observamos que la concentración de sodio plasmático fue significativamente inferior en el grupo de pacientes con genotipo C/C respecto al grupo de pacientes con genotipo C/G o G/G. Al comparar los tres grupos entre sí no observamos diferencias en cuanto al índice de Child-Pugh, concentración plasmática de albúmina, bilirrubina, creatinina, potasio, tiempo de protrombina, presión arterial media o frecuencia cardíaca. Por el contrario, no objetivamos ninguna asociación entre los SNPs obtenidos de la AQ-2 y los trastornos hidroelectrolíticos de nuestros pacientes.

Conclusiones: Los pacientes portadores del alelo C/C del rs1049305 de la AQ-1 presentaron hiponatremia dilucional lo que no sucedió con los portadores de los genotipos C/G o G/G. Por tanto, estos resultados preliminares sugieren que este SNP de la AQ-1 podría afectar a la expresión o composición de la proteína que codifica y modificar su función.

Este trabajo ha sido financiado en parte con beca FIS PI030330.

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE MÉTODOS NO INVASIVOS EN LA EVALUACIÓN RUTINARIA DE LA SEVERIDAD DE LA FIBROSIS EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C

S.M. Martínez^a, M. Domínguez^a, G. Fernández-Varo^b, P. González^a, R. Bataller^a, E. Sampson^c, W. Jiménez^b, X. Forns^a y J.M. Sánchez-Tapias^a

^aUnidad de Hepatología, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques. ^bServicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínic, IDIBAPS, Ciberehd, Barcelona. ^cSiemens Medical Solutions, NY, USA.

Introducción: La predicción del estadio de fibrosis hepática mediante tests no invasivos podría reemplazar a la biopsia hepática en la evaluación de la severidad de la enfermedad en la hepatitis crónica por virus C (HCC).

El objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento diagnóstico de varios métodos no invasivos, solos o en combinación, en la detección de fibrosis significativa o cirrosis hepática en pacientes con HCC.

Métodos: El rendimiento diagnóstico para predecir fibrosis hepática fue investigado en una cohorte de 373 pacientes con HCC candidatos a tratamiento antiviral mediante los siguientes métodos no invasivos: Score de Forns, índice APRI, elastografía transitoria y marcadores de matriz extracelular ácido hialurónico (HA), colágeno IV (Col4), péptido amino-terminal de colágeno tipo III (PIIINP), e inhibidor tisular de metaloproteína (TIMP-1). Estos últimos

marcadores fueron combinados en dos modelos: ELF (edad, PIIINP, TIMP-1 y HA) y 4-Marker (PIIINP, TIMP-1, Col4 y HA) (Rosenberg et al. Gastroenterol 2004). El estadio de fibrosis hepática fue evaluado según la clasificación de Scheuer. La eficacia diagnóstica de cada método fue determinada por el área bajo la curva ROC (AUROC). El valor predictivo de la combinación de estos métodos fue evaluada mediante regresión múltiple.

Resultados: La edad media de los pacientes fue de 47,26 (17-69) años, y 251 (62,6%) eran varones. La distribución de los estadios de fibrosis fue: F0: 11,5%, F1: 25,9%, F2: 25,7%, F3: 9,5% y F4: 27,4%. Las AUROCs de los diferentes métodos para \geq F2 y F4 se describen en la tabla 1. El mejor rendimiento diagnóstico fue obtenido por la combinación del índice APRI y FibroScan para $F \geq 2$ (AUROC = 0,88), y Score de Forns y FibroScan (AUROC = 0,90) para F4.

Tabla 1

Histología hepática n = 373	AUROC						
	Score de Forns n = 373	Índice APRI n = 373	FibroScan n = 156	ELF n = 245	4 Marker n = 245	APRI + Fibroscan n = 156	Score de Forns + Fibroscan n = 156
F \geq 2	0,797	0,816	0,858	0,807	0,806	0,880	0,874
F4	0,851	0,871	0,869	0,810	0,804	0,883	0,900

Conclusiones: Estos resultados demuestran que los métodos no invasivos son precisos en la predicción de fibrosis significativa y cirrosis. La combinación de estos métodos mejora la exactitud diagnóstica, con el mejor rendimiento obtenido mediante elastografía transitoria y marcadores indirectos de fibrosis.

Sesión general 5

Moderadores: José Carlos Fernández Checa (Barcelona) y Rafael Bárcena (Madrid)

PRESENCIA DE MUTANTES RESISTENTES A INHIBIDORES DE LA PROTEASA DEL VHC EN AUSENCIA DE TRATAMIENTO

M. Cubero^{a,b,c}, J.I. Esteban^{a,b,c}, T. Otero^a, S. Sauleda^{c,d}, M. Bes^{c,d}, R. Esteban^{a,b,c}, J. Guardia^{a,b,c} y J. Quer^{a,b,c,*}

^aHepatología, Medicina Interna, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona. ^bUniversitat Autònoma de Barcelona. UAB. Bellaterra.

^cCIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) del Instituto de Salud Carlos III. ^dBanc de Sang i de Teixits, Institut Català de la Salut, Barcelona.

Antecedentes: El desarrollo de inhibidores selectivos contra la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C (VHC) ha supuesto la creación de nuevas expectativas en el tratamiento de la infección por VHC. Dichos inhibidores han sido evaluados individualmente tanto in vivo como in vitro y en todos los casos se ha demostrado la aparición/selección de virus mutantes resistentes a estos antivirales. Estos estudios han permitido identificar algunas de las mutaciones responsables de conferir resistencia a un antiviral concreto. La mutación A156T se ha mostrado como la más eficaz para conferir resistencia a la gran mayoría de los inhibidores de NS3 que han sido o están en estudios en fase clínica (BILN2061, VX-950, SCH446211 (SCH6) y SCH503034).

Objetivos: Estudio de la presencia de mutantes resistentes a inhibidores de la proteasa NS3 en pacientes crónicos que no han sido tratados previamente con estos agentes antivirales.

Métodos: A partir de una biopsia hepática de un paciente crónico se amplificaron, clonaron y secuenciaron 128 clones de un fragmento de 567 nucleótidos del dominio proteasa NS3. Se utilizó la Pfu DNA polymerase con tasa de mutación de 1 error por cada 0,13-6,5x10⁷ nucleótidos incorporados. Aplicando nuestras condiciones de trabajo, realizamos un estudio control que consistió en amplificar (70 ciclos), clonar y secuenciar un clon de secuencia conocida y detectamos 1 mutación en 90864 nucleótidos secuenciados.

Resultados: De los 128 clones secuenciados (72.572 nucleótidos), aparecieron 51 mutaciones respecto a la secuencia consenso, de las cuales 20 eran mutaciones no-sinónimas (inducen cambio de aminoácido). El 86% (110/128) de las secuencias eran idénticas a nivel proteico demostrando que la región proteasa NS3 es una región muy conservada. La principal observación fue la presencia de la mutación A156T en la población de secuencias que se encuentran infectando el hígado, representando el 0,78%. La población viral, además presenta mutadas las posiciones 86 y 89 que se han involucrado en compensación de la pérdida de fitness (capacidad de replicación) que induce la mutación A156T. Se ha demostrado en estudios en cultivo con replicones del VHC, que dicha mutación ejerce una elevada y efectiva resistencia a los inhibidores de la proteasa viral.

Conclusión: Estos datos apoyan resultados previos con otros virus en el sentido que mutantes resistentes a antivirales se encuentran formando parte de la quasispecies viral de manera espontánea con mayor o menor representación según la fitness relativa de cada mutante individual. Las mutaciones P89Q and Q86P podrían estar compensando el efecto negativo sobre la fitness del mutante A156T, lo cual explicaría que este mutante represente el 0,78% de la población viral en hígado. Estos resultados sugieren que el tratamiento con uno de estos inhibidores de proteasa en monoterapia o combinados entre ellos seleccionará el mutante resistente y por tanto su efecto antiviral será limitado.

LA INHIBICIÓN DE LA ESCUALENO SINTASA O EL SILENCIAMIENTO DE STARD1 AUMENTAN LA SUSCEPTIBILIDAD DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR A LA QUIMIOTERAPIA

J. Montero, A. Morales, L. Llacuna, J.M. Lluís, C. García-Ruiz, A. Colell y J.C. Fernández-Checa

Unidad de Hepatología, Instituto Malalties Digestives, Hospital Clinic I Provincial, CIBEREHD, IDIBAPS, Instituto Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC.

Una de las características de la carcinogénesis es la pérdida del control de la síntesis de colesterol. Muchos tipos de tumores sólidos, entre ellos el carcinoma hepatocelular (CH), exhiben una mayor capacidad de síntesis de colesterol vía inducción de la HMG-CoA reductasa (HMG-CoAR) y una resistencia a la inhibición de la HMG-CoAR por el colesterol el cual se acumula en múltiples membranas incluyendo la mitocondria por la acción de StAR(StARD1), responsable del tráfico intramitocondrial de colesterol. La HMG-CoAR cataliza la formación de mevalonato siendo este posteriormente metabolizado a farnesil difosfato, el cual da lugar a la generación de isoprenoides o de colesterol vía síntesis de escualeno por la escualeno sintasa (ES). Aunque las estatinas recientemente han adquirido una nueva dimensión en la prevención de ciertos tipos de cáncer (colorectal, melanoma, próstata, Nat. Rev. Cancer, 2005), la inhibición de la HMG-CoAR por las estatinas bloquearía no solo la generación de colesterol sino también la formación de isoprenoides lo que explicaría, en parte, el efecto terapéutico de las estatinas independientemente de la regulación del colesterol. Puesto que el papel de la ES o de StARD1 en la respuesta de CH a la quimioterapia es desconocido, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la inhibición de ES y el silenciamiento de StARD1 en líneas de CH y en modelo in vivo en ratones atímicos inoculados con CH.

Métodos: La respuesta de las líneas celulares CH de rata (H35) y humanas (HepG2) a quimioterapia via mitocondria (trioxido de arsénico, ATO; lonidamine, Lon; tapsigargina, Tap) se analizó con o sin inhibición de la ES por YM-53601 o silenciamiento de StARD1 tras transfección con siRNAs. Asimismo, el crecimiento y tamaño tumoral, neovascularización (CD34) y respuesta a quimioterapia (doxorubicina, Dox y TRAIL) se determinó en ratones atímicos inoculados con HepG2 y tratados con YM-53601.

Resultados: Tanto las H35 como las HepG2 mostraron una mayor resistencia a la acción citotóxica de ATO, Lon, Tap y Dox con respecto a células primarias. El tratamiento con YM-53601 redujo el nivel de colesterol total y mitocondrial en ambas líneas celulares aumentando la sensibilidad a ATO, Lon, Tap y Dox. Asimismo, la reducción de StARD1 por siRNA redujo el nivel de colesterol tumoral sensibilizando a ambas líneas a la acción de Dox. Además el tratamiento de los ratones atímicos con YM-53601 redujo el nivel de colesterol intratumoral en la mitocondria incrementando la acción citotóxica de Dox reflejado en el número de células apoptóticas tumorales por TUNEL. Sin embargo, el tratamiento con YM-53601 no modificó la formación de microvasos analizado mediante inmunohistoquímica con Ab anti-CD34.

Conclusiones: La inhibición de la escualeno sintasa o el silenciamiento de StARD1 incrementan la susceptibilidad del CH a la quimioterapia via disminución del colesterol mitocondrial.

EL DESCENSO DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CRM) EN LA ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA ESTÁ ORIGINADO POR UN DESCENSO DE ESTE COMPLEJO EN LAS MITOCONDRIAS Y NO POR UN DEFECTO EN SU ENSAMBLAJE

I. García-Ruiz, C. Rodríguez-Juan, T. Díaz-Sanjuán, T. Pérez Carreras, P. Solís-Muñoz y J.A. Solís-Herruzo
Centro de Investigación. Hospital Universitario "12 de Octubre". Madrid.

En estudios previos hemos mostrado que la actividad de la CRM está disminuida en los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica y en ratones obesos, ob/ob. El tratamiento con rosiglitazona (RGZ) empeora aún más la actividad de la CRM.

Objetivos: En el presente estudio analizamos el proceso de ensamblaje de las subunidades del complejo I de la CRM, su actividad enzimática y los efectos del tratamiento con RGZ sobre estos efectos.

Material y métodos: Todos los experimentos han sido realizados en ratones C57BL/6J de los tipos "salvaje" y "ob/ob" distribuidos en cuatro grupos: grupo I, ratones salvajes (controles); grupo II, ratones salvajes tratados con 1 mg/Kg/día de RGZ durante 12 semanas. Grupo III, ratones ob/ob no tratados; grupo IV, ratones ob/ob tratados con RGZ durante 12 semanas. Tras el periodo de tratamiento, los ratones fueron sacrificados y de sus hígados se aislaron las proteínas mitocondriales. Tras ello, los complejos enzimáticos ensamblados fueron separados por electroforesis unidimensional con azul Serva y valoramos la actividad del complejo I en gel de electroforesis. Por último, aislamos las subunidades del complejo I por electroforesis de dos dimensiones previa disociación del complejo I en sus componentes.

Resultados: 1) confirmamos que la actividad enzimática del complejo I está muy disminuida en las mitocondrias hepáticas de los ratones ob/ob y que esta actividad disminuye aún más en los ratones salvajes y ob/ob tratados con RGZ. 2) En los ratones obesos, la cantidad de complejo I completamente ensamblado estaba muy disminuida en relación con la existente en los controles. 3) En ambos tipos de ratones, el tratamiento con RGZ originó que el ensamblaje del complejo I no sea completo y que aparezca un subcomplejo de menor pero molecular. 4) La separación de las subunidades del complejo I por electroforesis bidimensional estudiadas mostró que todas las subunidades estudiadas estaban muy disminuidas en cantidad pero no detectamos la presencia de subcomplejos indicando que en los ratones ob/ob el ensamblaje de los componentes del complejo I no está alterado. Por el contrario, las dos subunidades del complejo III estudiadas (core II; FeS), además de reducidas en cantidad, aparecían descompuestos en numerosos subcomplejos indicando que existe un trastorno en su ensamblaje o un aumento de su degradación. 5) En los ratones tratados con RGZ, la cuantía de complejo I estaba aumentada pero aparecía un subcomplejo de peso molecular ligeramente inferior al complejo completamente conformado, lo que sugiere que la RGZ produce un problema de ensamblaje en las fases finales.

Conclusiones: El ensamblaje del complejo I se produce correctamente en los ratones obesos, pero la cuantía de este complejo está muy disminuida lo que justifica su baja actividad. El tratamiento con rosiglitazona empeora la actividad de la enzima por interferir con el ensamblaje de sus componentes probablemente en sus fases finales.

IMPLICACIÓN DE CD151 EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

P. Sanz-Cameno^a, S. Martín-Vilchez^a, M.J. Borque^a, Y. Rodríguez-Muñoz^a, J. Medina, M. López-Cabrera^b y R. Moreno-Otero^a

^aUnidad de Hepatología, Hospital Universitario de La Princesa y Ciberehd. ^bUnidad de Biología Molecular, Hospital Universitario de La Princesa.

Objetivos: Se han propuesto diferentes receptores celulares del virus de la hepatitis C (VHC) pero ninguno de ellos es capaz de explicar completamente su marcado tropismo hepático. Entre ellos, CD81, perteneciente a la familia de las tetraspaninas, destaca como

factor indispensable pero no suficiente, por lo que se ha descrito reiteradamente la necesidad de otros co-receptores. Debido a la capacidad de las tetraspaninas para constituir complejos macromoleculares de membrana de carácter funcional al asociarse con determinadas moléculas, principalmente integrinas-beta 1 y otras tetraspaninas, nuestro objetivo es analizar la posible contribución de las moléculas vinculadas a CD81 en la superficie celular en la infección por el VHC.

Métodos: La expresión hepática de diversas tetraspaninas (CD9, CD81 y CD151) y de integrinas-beta 1 (VLA1-VLA6), así como la unión de la proteína E2 recombinante del VHC (E2) al tejido hepático procedente de pacientes con hepatitis crónica por VHC o al de individuos controles, así como a distintas líneas celulares hepáticas, se evaluó por inmunohistoquímica y citometría de flujo. La contribución específica de las moléculas estudiadas en la unión de E2 a las células hepáticas se investigó mediante experimentos de inmunoprecipitación en lisados celulares hepáticos obtenidos con detergentes de distinta astringencia (Brij96 y TritónX-100).

Resultados: Se observaron diferencias patentes en patrón de expresión de las tetraspaninas estudiadas en el hígado de los pacientes infectados por el VHC, con una considerable pérdida de la polaridad basolateral de membrana observada para CD81 y un aumento de la expresión de CD9 y CD151. La proteína E2 del VHC mostró un patrón más restringido de unión al tejido hepático que el estrictamente relacionado con CD81, distribuyéndose principalmente por los sinusoides hepáticos, particularmente en las células de Kupffer, donde la expresión de CD151 resultó incrementada en los hígados infectados por VHC. Adicionalmente, la unión efectiva de la proteína E2 a la superficie celular fue capaz de modificar la afinidad de uno de los anticuerpos anti-CD151 empleados. Los experimentos de inmunoprecipitación reflejaron la presencia de CD151 en los complejos de membrana celular que unen la proteína viral E2, incluso en las condiciones experimentales más estrictas (lisados con TritónX-100).

Conclusión: Estos resultados sugieren la participación de CD151 en la infección por el VHC como posible co-receptor e incitan el estudio detallado de su repercusión funcional, patofisiológica y terapéutica.

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN PROLONGADA DE LA SECRECIÓN GÁSTRICA ÁCIDA SOBRE LA SECRECIÓN GÁSTRICA, LA INCIDENCIA DE SOBRECRECIMIENTO BACTERIANO INTESTINAL Y LA TRANSLOCACIÓN BACTERIANA EN RATAS CIRRÓTICAS CON Y SIN ASCITIS

E. Sánchez^a, G. Soriano^a, B. Mirelis^b, B. González^a, J. Monés^a y C. Guarner^a

^aCIBERehd, Servicio de Patología Digestiva, Unidad de hepatología, Hospital de Sant Pau, UAB. ^bServicio de Microbiología, Hospital Sant Pau, Barcelona.

Introducción: La translocación bacteriana (TB), como consecuencia del sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI), juega un papel muy importante en la patogenia de las infecciones en la cirrosis. La inhibición prolongada de la secreción gástrica ácida (IPSGA) favorece el SBI y podría facilitar la TB.

Objetivos: Evaluar el efecto de la IPSGA con antiseoretos sobre la secreción gástrica, el SBI y la TB en ratas con cirrosis.

Material y métodos: Ratas cirróticas (CCl₄+fenobarbital) con o sin ascitis y control se randomizaron para ser tratadas con una inyección subcutánea de placebo (2 ml.suero), ranitidina (100mg/kg) o pantoprazol (8mg/kg) durante 14 días. En los días uno y previo a la laparotomía se realizó una ph-metría de dos horas. En la laparotomía se obtuvieron muestras de líquido ascítico, ganglios linfáticos mesentéricos, hígado, bazo, heces de íleon y líquido pleural para realizar cultivos.

Resultados: La mortalidad durante el estudio fue significativamente superior en ratas cirróticas con ascitis respecto a ratas cirróticas sin ascitis (p < 0,001) y ratas control (p < 0,01) pero no se observaron en ningún grupo diferencias entre ratas tratadas con placebo o con antiseoretos. La ranitidina y el pantoprazol aumentaron el pH gástrico respecto a las tratadas con placebo en todos los grupos (p < 0,001) La inducción de cirrosis aumenta de forma significativa la incidencia de SBI respecto a las ratas control tratadas con placebo

(0% vs 46%, $p < 0,05$). Los antiseoretos no aumentaron significativamente la incidencia de SBI en ratas cirróticas siendo similar en ratas con o sin ascitis (55% vs 49%). Los antiseoretos no modificaron la incidencia de TB en ratas control ni en cirróticas sin ascitis, pero aumentaron la TB en ratas con ascitis tratadas con ranitidina (10/15, $p < 0,05$), pantoprazol (9/15, $p = 0,07$) o cualquier antisecretor (19/30, $p < 0,05$) en comparación con ratas con ascitis tratadas con placebo (4/17) y sin ascitis tratadas con el mismo antisecretor ($p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$).

Conclusión: La IPSGA aumenta el pH en ratas control, cirróticas con o sin ascitis. La inducción de cirrosis aumenta el SBI. Los antiseoretos no producen un aumento adicional significativo del SBI en ratas cirróticas, pero aumentan la incidencia de TB en ratas cirróticas con ascitis. El tratamiento antisecretor prolongado se debería evaluar estrictamente en pacientes cirróticos con ascitis.

INFECCIÓN OCULTA POR VIRUS DE LA HEPATITIS B EN DONANTES DE SANGRE: PERFIL SEROLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

S. Sauleda^a, N. Casamitjana^a, M. Bes^a, J.I. Esteban^b, J. Guardia^b, L. Puig^a y V. Vargas^b

^aLaboratorio Seguridad Transfusional; Banc de Sang i Teixits. ^bServicio de Medicina Interna-Hepatología. Hospital General Universitario Vall d'Hebron. Universidad Autónoma. Barcelona.

Introducción: La infección oculta por virus de la hepatitis B (IOB) definida como la presencia de DNA VHB en ausencia de HBsAg en individuos con exposición previa al VHB, puede tener importancia en determinadas situaciones clínicas (ej: inmunodepresión). La implementación del cribado para DNA del virus de la hepatitis B (DNA VHB) en donaciones de sangre ha puesto de manifiesto la existencia de IOB entre la población supuestamente sana.

Objetivos: Determinar la incidencia de IOB entre las donaciones de sangre de Cataluña y caracterizar en los sujetos IOB su perfil serológico, molecular y de función hepática.

Sujetos y métodos: Se han incluido en este estudio los donantes de sangre con IOB identificados durante el cribado rutinario de las donaciones de sangre para DNA VHB entre Enero de 2006 y Septiembre de 2007. Se definió IOB como la presencia de DNA VHB en ausencia de HBsAg y con anti-HBc total positivo (IgM negativo) como prueba confirmatoria de exposición pasada. Los donantes IOB fueron seguidos al mes, según rutina de banco de sangre y, previo consentimiento, de forma trimestral para reevaluación de carga viral, genotipo VHB, serología y pruebas de función hepática.

Resultados: Entre Enero de 2006 y Septiembre de 2007, se cribaron 477.297 donaciones de sangre entre las cuales se identificaron 29 donantes IOB, lo que representa una incidencia de 1 IOB por cada 16.500 donaciones. La mayoría de los donantes IOB fueron varones (25/29; 86%) y la media de edad fue de 56 ± 6 años. Once (38%) de los sujetos IOB fueron anti-HBs negativos, mientras que del resto, otros once presentaron niveles de anti-HBs superiores a 10 UI/L (entre 10 y 77,6 UI/L). Todos los donantes tenían niveles de ALT normales en el momento de la donación ($17,6 \pm 7$ U/L) y la carga viral del VHB fue positiva aunque por debajo de rango dinámico (< 25 UI/mL). El genotipo viral se pudo realizar en 9 sujetos, siendo genotipo VHB-A en dos donantes y VHB-D en los otros 7. Se ha podido realizar el seguimiento en 23 de los 29 donantes identificados, con una mediana de seguimientos de 69 días (11 a 320 días). En 4 donantes IOB, el DNA VHB se negativizó en algún momento del seguimiento, pero en la mayoría (19/23; 83%) el DNA VHB continuó detectable. Durante el seguimiento, en ninguno de los 29 donantes se objetivaron cambios en los marcadores

hepáticos (niveles de transaminasas persistentemente normales) ni serológicos (HBsAg negativo; niveles similares de anti-HBs).

Conclusiones: La infección oculta por VHB no es infrecuente entre los donantes de sangre. La mayoría de donantes IOB son varones y infectados por genotipo VHB-D. A pesar de la baja carga viral, el DNA VHB persiste positivo durante el seguimiento en la gran mayoría de casos, aunque no se evidencia enfermedad hepática.

INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE GLUTATION S-TRANSFERASA M1 Y T1 EN LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR HEPATOTOXICIDAD IDIOSINCRÁSICA (DILI)

M.I. Lucena^a, C. Martínez^b, E. Ulzurrun^a, E. García-Martín^c, J. Agundez^b, Y. Borraz^a, S. López-Ortega^d, A. Fernández-Castañer^d, G. Peláez^e, M. Romero-Gómez^f, A. Madrazo^f, A. Castiella^g, R. Planas^h, J.M. Navarroⁱ, J. Salmerónⁱ, R.J. Andrade^d en representación del Grupo de Estudio de las Hepatopatías asociadas a medicamentos (GEHAM)

^aServicio de Farmacología Clínica, ^bDept. Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, Badajoz; ^cDep. Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz; ^dUnidad de Hepatología, H. Universitario Virgen de la Victoria, Facultad de Medicina, Málaga; ^eServicio Ap Digestivo, H. Torrecárdenas, Almería; ^fServicio de Ap Digestivo, H Valme, Sevilla; ^gServicio de Ap Digestivo, H Mendaró, Guipúzcoa; ^hServicio de Ap Digestivo, H Germans Trias y Pujol, Badalona, ⁱServicio de Ap Digestivo, H Costa del Sol, Marbella, Málaga; ^jServicio de Ap Digestivo, HU S Cecilio, Granada.

Introducción y objetivos: Las enzimas de Fase II, y en particular las de conjugación, juegan un papel crucial en los mecanismos de detoxificación de fármacos y xenobioticos previniendo la unión de los metabolitos reactivos a las proteínas celulares. La actividad de las glutation-s-transferasas (GSTs) T1 y M1 citosolicas es polimórfica debido a una ausencia completa de los genes GSTT1 y GSTM1 que aparece en homocigosidad (genotipos nulos) en un 50% y un 25% de sujetos Caucasicos, respectivamente. Los genotipos nulos de GST están relacionados con la susceptibilidad hacia muchos tipos de cáncer, enfermedad hepática alcohólica y hepatitis tóxica por troglitazona y tacrina. Nuestro objetivo fue determinar si una reducción determinada genéticamente en la capacidad para detoxificar compuestos electrofílicos, que ocurre entre los individuos con genotipos nulos de GST, puede jugar un papel en la determinación del riesgo de DILI y su curso clínico.

Métodos: Se recolectaron 154 pacientes (edad media 53 años, 80 mujeres) con un diagnóstico de DILI según la escala de CIOMS y 250 controles sanos ajustados por edad y sexo. El genotipado de GSTT1 y GSTM1 se llevo a cabo en ADN genómico mediante amplificación múltiple.

Resultados: La tabla muestra la distribución de los genotipos de GSTT1 y GSTM1 de los pacientes y de los sujetos sanos. La frecuencia del genotipo nulo combinado era significativamente superior en pacientes DILI (OR = 2,70; 95% CI = 1,45-5,03; Pc = 0,0034). La comparación de variables demográficas, clínicas y parámetros de laboratorio en los pacientes DILI clasificados por los genotipos de GSTT1 y GSTM1 combinados, no mostró diferencias en ninguna de las variables evaluadas entre grupos, excepto por la presencia de un número significativamente más alto de mujeres en el genotipo nulo combinado ($p < 0,01$).

Conclusiones: La doble mutación nula de GSTT1 y GSTM1 podría jugar un papel importante en la determinación de la susceptibilidad a desarrollar DILI, como un mecanismo que ocurre independientemente del medicamento involucrado y predominantemente en mujeres.

	GSTM1 GENOTYPE n(%)		GSTT1 GENOTYPE n(%)		Nº. OF ACTIVE GENOTYPES n(%)		
	Null	Active	Null	Active	Two	One	None
Cases (154)	86 (55,8%)	68 (44,2%)	45 (29,2%)	109 (70,8%)	51 (33,1%)	75 (48,7%)	28 (18,2%)
Controls (250)	113 (45,2%)	137 (54,8%)	58 (23,2%)	192 (76,8%)	97 (38,8%)	134 (53,6%)	19 (7,6%)
Statistics	O.R0 1,53	O.R. = 1,37	O.R = 0,78	O.R = 0,82	O.R = 078		
	95% C.I = 1,02-2,30		95% C.I = 0,87-2,15		95% C.I = 0,51-1,19	95% C.I = 1,02-0,63	95% C.I = 1,45-5,03
	Pc = 0,085		Pc = 0,394		Pc = 0,544	Pc = 0,730	Pc = 0,003

Test for trend of null alleles Kruskal-Wallis H: 10,43, df = 2, $p = 0,005$ *Pc after Bonferroni's correction

Sesión general 6

Moderadores: Agustín Albillos (Madrid) y Francisco Jorquera (León)

VALORACIÓN DE LA PERFUSIÓN HEPÁTICA MEDIANTE ECOGRAFÍA CON MEDIO DE CONTRASTE: UN NUEVO MÉTODO OBJETIVO Y NO INVASIVO PARA EL ESTUDIO DE LA PERFUSIÓN HEPÁTICA EN PACIENTES CON CIRROSIS

P. Bellot^a, C. Nicolau^b, A. Berzigotti^{a,b}, J.C. García-Pagán^a, J.G. Abraldes^a, R. Gilabert^b y J. Bosch^a

^aLaboratorio de Hemodinámica Hepática, Liver Unit, Hospital Clínic i Provincial, IDIBAPS y Ciberehd. ^bCentre de Diagnostic per l'Imatge, Hospital Clínic i Provincial, IDIBAPS y Ciberehd, Barcelona, España.

Introducción: La cinética de reaparición de microburbujas de medio de contraste ecográfico mediante ultrasonidos se ha utilizado con éxito para valorar la perfusión miocárdica y renal. Datos preliminares en individuos sanos sugieren que este método puede aplicarse para estudiar la perfusión hepática de forma no invasiva. Este trabajo de investigación se ha realizado para valorar esta posibilidad.

Métodos: En 52 pacientes con cirrosis hepática enviados a nuestro Centro para valorar el gradiente de presión venosa hepática (GPVH) se cuantificó la perfusión hepática durante una infusión i.v. continua de microburbujas (SonoVue[®], 3 ml/min tras bolo de 0,5 ml). A los 95 segundos éstas se destruyeron y se examinó la reperfusión (imaging armónico intermitente). La curva de reaparición de microburbujas se analizó en imágenes grabadas; la curva se expresa matemáticamente y $= A(1 - e^{-bt})$, en la cual A es la fracción de volumen sanguíneo y b la velocidad de las microburbujas. La perfusión hepática en la región analizada (perfusión regional hepática, PRH) se calcula como $A \times b$. Durante el cateterismo de venas suprahepáticas se midieron el flujo sanguíneo hepático (FSH) (infusión de verde de indocianina-ICG), el GPVH (catéter balón) y el gasto cardíaco (catéter de Swan-Ganz).

Resultados: 26 pacientes tenían una cirrosis compensada, y 26 descompensada. La velocidad de reaparición de las microburbujas fue más elevada en los pacientes con cirrosis que en los sujetos sanos (β $0,38 \pm 0,20$ vs $0,22 \pm 0,05$, $p = 0,015$). La PRH se correlacionó con el Child-Pugh score ($R = 0,33$, $p = 0,01$), y con sus componentes objetivos (albúmina $R = -0,35$, $p = 0,01$; bilirrubina $R = 0,29$, $p = 0,03$; tasa de protrombina $R = -0,34$, $p = 0,02$). La PRH se correlacionó de forma directa con el FSH ($R = 0,52$, $p = 0,003$), y de forma inversa con los índices de reserva funcional hepática: extracción de ICG ($R = -0,54$, $p = 0,001$) y aclaramiento hepático ($R = -0,39$, $p = 0,027$). Además, la PRH se correlacionó con el síndrome hiperdinámico: gasto cardíaco ($R = 0,36$, $p = 0,01$), presión arterial media ($R = -0,43$, $p = 0,003$), resistencia vascular sistémica ($R = -0,46$, $p = 0,003$), y débilmente con el GPVH ($R = 0,28$, $p = 0,05$).

Conclusiones: La PRH se halla aumentada en los pacientes con cirrosis hepática, y se correlaciona con el grado de insuficiencia hepática y con el estado hiperdinámico. Asimismo, la PRH se correlaciona con el FSH y con la alteración de la perfusión hepática efectiva, expresada por el aclaramiento y el índice de extracción del ICG. Esto sugiere que en la cirrosis la PRH se eleva por la presencia de shunts anatómicos o funcionales. La determinación de la PRH por ecografía con contraste puede considerarse un nuevo método objetivo y no invasivo para evaluar la gravedad de la disfunción hepática en pacientes con cirrosis.

ALTERACIÓN DE LAS UNIONES INTERCELULARES ESTRECHAS (TIGHT JUNCTIONS) DE LOS HEPATOCITOS POR PROTEÍNAS DE LA ENVUELTA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

I. Benedicto^a, F. Molina^a, A. Maldonado^a, J. Prieto^b, R. Moreno^c, R. Aldabe^b, M. López^a y P. Majano^a

^aUnidad de Biología Molecular. Hospital Universitario de la Princesa. CIBER-EHD, Madrid. ^bDivisión de Terapia Génica y Hepatología. Centro de Investigación en Medicina Aplicada (CIMA), Pamplona. ^cUnidad de Hepatología, Hospital Universitario de la Princesa. CIBER-EHD, Madrid.

Introducción: En el hígado las uniones estrechas entre las células hepáticas (tight junctions/TJ) desempeñan un papel determinante en funciones como la formación y secreción de la bilis.

Objetivo: En este trabajo empleamos un sistema de replicación in vitro del VHC con objeto de determinar el efecto de este virus sobre la estructura y funcionalidad de las TJ.

Materiales y métodos: La composición, estructura y funcionalidad de las TJ se analizó mediante Western blot, microscopía confocal y ensayo de permeabilidad en la línea celular derivada de hepatoma humano Huh-7 y en un panel de clones generados en esta línea celular conteniendo un replicón genómico o subgenómico del VHC.

Resultados: Las proteínas asociadas a TJ ocludina, claudina-1 y Zonula Occludens protein-1 (ZO-1) desaparecieron de su localización habitual en la zona de contacto intercelular en los clones con el replicón genómico, capaces de expresar todas las proteínas del VHC, pero no así en los subgenómicos que expresan únicamente las proteínas virales no estructurales. Además pudimos observar una acumulación de la proteína ocludina en el retículo endoplásmico de estas células. La funcionalidad de las TJ también presentaba alteraciones en células con el replicón genómico en comparación a la línea parental o a los clones subgenómicos. La eliminación del virus tras tratamiento con interferón-alfa provocó un restablecimiento de la estructura y funcionalidad de las TJ. El análisis mediante microscopía confocal mostró que el acúmulo en el retículo endoplásmico citoplásmico de ocludina co-localizaba con la proteína viral E2, asociación que también pudo confirmarse mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Finalmente, utilizando un modelo de infección con VHC pudimos observar como la infección con dicho virus provocó una acumulación citoplásmica de ocludina.

Conclusión: Estos resultados sugieren que las proteínas estructurales del VHC, muy posiblemente la proteína de la envuelta E2, pueden alterar las uniones intercelulares estrechas (TJ). Estos resultados podrían ayudar a explicar como se producen algunas de las alteraciones asociadas a la infección por el VHC.

EVOLUCIÓN CLÍNICA Y PRONÓSTICO DE LA ASCITIS NEUTROCÍTICA CON CULTIVO NEGATIVO (ANCN) Y LA PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA (PBE)

N. Cañete^a, E. Erice^b, I. Cirera^a, A. Bargalló^b, R.M. Morillas^b, M. García-Retortillo^a, S. Coll^a, F. Bory^a, H. Masnou^b, M.D. Giménez^a, R. Planas^b y R. Solà^a

^aSección de Hepatología, Servicio Digestivo. Hospital del Mar. IMIM. Barcelona. ^bSección de Hepatología, Servicio Digestivo, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona.

La infección del líquido ascítico incluye tanto la clásica peritonitis bacteriana espontánea (PBE), como la ascitis neutrocítica cultivo negativo (ANCN). En el pasado, el significado clínico y el pronósti-

co de la ANCN fue un punto controvertido, al ser considerada como una consecuencia de la baja sensibilidad de los métodos de cultivo utilizados, pero con un pronóstico a corto y medio plazo similar a la PBE.

Objetivo: Analizar la incidencia, el curso clínico y el pronóstico de la PBE y de la ANCN en un grupo de pacientes tras presentar su primera descompensación ascítica.

Pacientes y métodos: Un total de 263 pacientes cirróticos consecutivos que presentaron la primera descompensación ascítica entre agosto de 1997 y diciembre de 2001 fueron seguidos de forma prospectiva durante 41 ± 3 meses. En todos los pacientes que presentaron síntomas de infección y/o deterioro clínico se realizó análisis del líquido ascítico, que incluía recuento celular total y diferencial, niveles de proteínas y cultivos microbiológicos inoculando 10 mL de líquido ascítico en botes de hemocultivo (BACTEC).

Resultados: Cincuenta y ocho pacientes desarrollaron 83 episodios de infección del líquido ascítico (extrahospitalaria 72%). En 44 episodios (53%) el cultivo fue negativo (ACNC) y en 37 (47%) fue positivo (PBE). Al ingreso, los pacientes con ANCN presentaban una función hepática y renal mejor que los pacientes con PBE, con mayor tiempo de protrombina (62 vs 49% ; $p < 0,001$) y albúmina ($33 \pm 0,9$ vs $29 \pm 0,9$ g/L; $p < 0,02$), menor incidencia de encefalopatía (18 vs 46% ; $p < 0,05$), y menor puntuación de Child-Pugh ($8,9 \pm 0,3$ vs $10,1 \pm 0,3$; $p < 0,01$) y de MELD ($13,3 \pm 1,1$ vs $18,9 \pm 1,2$; $p < 0,001$). El recuento de PMN en líquido ascítico fue menor en el grupo de ANCN que en el grupo de PBE (1256 ± 252 vs 5513 ± 1117 cells/mL; $p < 0,001$). La infección del líquido ascítico se resolvió de forma más precoz en los pacientes con ANCN que en los que presentaban PBE ($4,2 \pm 0,3$ vs $6,7 \pm 0,9$ días; $p < 0,01$). Los pacientes con ANCN presentaron una menor incidencia de insuficiencia renal inducida por la infección que los pacientes con PBE ($18,2$ vs $38,5\%$; $p = 0,04$). Aunque la mortalidad fue similar en ambos grupos (27 vs 41% ; NS), se observó una tendencia a presentar una menor mortalidad acumulada al año en el grupo de pacientes con ANCN (57 vs 34% ; $p = 0,09$).

Conclusión: La ANCN acontece principalmente en cirróticos con una enfermedad hepática menos evolucionada, y parece tener un curso clínico y pronóstico mejor que la PBE aunque continúa presentando una elevada mortalidad.

NIVEL, FENOTIPO Y ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS FOXP3+CD4+ EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR LOS VIRUS DE LA HEPATITIS C Y/O VIH

N.I. Rallón, M. López, J. García-Samaniego, V. Soriano, M. Romero, P. Labarga, P. García-Gascó, S. Albertos y J.M. Benito *Servicios de Hepatología y Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III. CIBEREHD. Madrid.*

Las infecciones por VIH y VHC pueden alterar la población de las células T CD4+ reguladoras (Treg). Esta subpoblación celular contribuye a la persistencia viral inhibiendo la respuesta inmune específica de células T.

Objetivo: Analizar el nivel, el fenotipo y el grado de activación de las células Treg en pacientes con infección por VHC y/o VIH.

Métodos: Se estudiaron 91 pacientes: 20 controles, 20 VHC-/VIH+, 20 VHC+/VIH- y 31 VHC+/VIH+. Todos los pacientes VHC+ tenían ARN-VHC detectable. Las células Treg fueron definidas como células T CD4+ que expresan Foxp3+. El nivel, fenotipo (basado en la expresión de los marcadores CD25, CD45RA, CD27 y CD127) y el grado de activación (basado en la expresión del marcador CD38) de estas células fueron analizados mediante citometría de flujo. Las diferencias entre grupos se evaluaron utilizando pruebas estadísticas no paramétricas.

Resultados: Las medias de linfocitos CD4 y ARN-VIH de los pacientes VIH+ fueron de 486 ± 267 células/ μ l y $2,6 \pm 1,4$ log copias/ml (67% con TARGA). El valor medio de ARN-VHC en los pacientes VHC+ fue de $6,1 \pm 1,1$ log UI/ml. El nivel de las células Treg fue significativamente mayor en los pacientes VIH+ (con y sin coinfección por VHC) que en los controles sanos y los pacientes VHC+/VIH- ($p = 0,01$). Tanto en pacientes como en controles úni-

camente el 50% de las células Treg expresaron CD25. El 95% de las células Treg CD25+ tenían fenotipo CD45RA- CD127- en todos los grupos, mientras que las células Treg CD25- fueron más heterogéneas en términos de expresión de CD45RA y CD127. Globalmente, el 65% de las células Treg fueron CD45RA- CD27+ (subpoblación memoria central), sin diferencias entre controles y pacientes. Sin embargo, las células Treg naive (CD45RA+ CD27+) fueron menos frecuentes en los pacientes que en los controles ($p = 0,04$). La activación de células Treg fue mayor que la de células T CD4+ totales en todos los grupos ($p < 0,005$) y más elevada en los pacientes VIH+, especialmente en la subpoblación memoria central ($p < 0,0001$). No se observaron diferencias entre los pacientes VIH+/VHC- y los coinfectados VIH/VHC. En los pacientes VIH+ hubo una correlación inversa y significativa entre la cifra de linfocitos T CD4 y el nivel de las células Treg ($\rho = -0,54$; $p < 0,0001$).

Conclusiones: La infección por VIH, al contrario que la infección por VHC, induce un incremento de las células Treg activadas. Según la expresión de CD25 se pueden definir dos subpoblaciones de células Treg con un diferente perfil fenotípico. El nivel de células reguladoras aumenta en paralelo a la disminución de los linfocitos T CD4+, lo que podría contribuir al curso acelerado de la enfermedad hepática en los pacientes coinfectados.

TRÁFICO CITOSÓLICO-NUCLEAR DE ÁCIDOS BILIARES Y COLOCALIZACIÓN CON EL RECEPTOR NUCLEAR FXR EN HEPATOCITOS DE RATA

R. Rosales, M.J. Monte, R.I.R. Macías, A.G. Blázquez, P. Martínez-Becerra, M.J. Martínez-Becerra, F. González-San Martín, M.A. Serrano y J.J.G. Marín

Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos (HEVEFARM). Universidad de Salamanca. CIBEREhd.

Antecedentes: Varios receptores nucleares (sobre todo el FXR), cuyos ligandos son los ácidos biliares, controlan la expresión de proteínas (enzimas y transportadores) implicadas en la homeostasis de estos esteroides ácidos. Se ha sugerido que los ácidos biliares alcanzan el núcleo de los hepatocitos tras su unión en el citosol a los receptores de glucocorticoides u otras proteínas citosólicas.

Objetivos: Investigar los factores que determinan la entrada y salida de los ácidos biliares al núcleo de los hepatocitos y comprobar la interacción con el receptor nuclear FXR en el interior de esta organela.

Métodos/Resultados: Se incubaron hepatocitos de rata con derivados de ácidos biliares sintetizados por conjugación con fluoresceína de ácido glicocólico, ursodesoxicólico o quenodesoxicólico (CGamF, UDCGamF o CDCGamF). Mediante microscopía confocal se observó que estos compuestos no se distribuían de forma homogénea en el núcleo, sino que aparecían unidos o englobados en la envuelta nuclear y, dentro del núcleo, concentrados en ciertas regiones cuyo contenido en DNA era bajo. Por inmunocitoquímica se comprobó que en esas regiones también se localizaba el FXR. Utilizando citometría de flujo y preparaciones de núcleos aislados de hepatocitos de rata se comprobó que eran capaces de excluir FITC-dextranos de elevado peso molecular, aunque cargaban FITC-dextrano de 4 kDa \approx FITC > CGamF. Modificando el volumen de los núcleos en medios con diferentes concentraciones de sacarosa (0-250 mM) se observó una relación lineal entre el volumen nuclear y la carga de estos tres compuestos fluorescentes. El término independiente de las rectas de regresión, que probablemente sea un reflejo de la unión inespecífica a la envuelta nuclear, fue similar para todos ellos, pero se encontraron marcadas diferencias en las pendientes (FITC \geq FITC-dextrano > CGamF). La carga nuclear de CGamF, UDCGamF y FITC se redujo por la presencia de ATP en el medio de incubación. El eflujo de UDCGamF desde núcleos previamente cargados con este compuesto se estimuló por la presencia de ATP y por la ausencia de Ca^{2+} en el medio. Cuando se aislaron las envueltas nucleares por digestión de los núcleos con DNasa/RNasa, y se investigó por Western blot la presencia en ellas de bombas exportadoras, se detectó la expresión en estas membranas de proteínas ABC, como la MRP2. Los análisis por microscopía confocal con núcleos enteros confirmaron este hallazgo.

Conclusión: Los ácidos biliares pueden entrar en el núcleo por difusión sin necesidad de ser transportados por proteínas citosólicas. Esto permite su interacción con receptores nucleares localizados en el interior del núcleo de los hepatocitos, que pueden así detectar los niveles intracelulares de estos compuestos. Por otra parte la presencia de un mecanismo ATP-dependiente en la envuelta nuclear favorece la renovación del contenido intranuclear de ácidos biliares.

CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADAS POR TGF-BETA DURANTE EL PROCESO DE TRANSDIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS

L. García Pozo^a, M.E. Miquilena Colina^a, T. Lozano Rodríguez^a, C. Rodríguez Juan^b, L. García Ruiz^b, T. Díaz Sanjuán^b, J.A. Solís Herruzo^b y C. García Monzón^a

Unidad de Investigación (Laboratorio de Hepatología Experimental)^a, Hospital Universitario Santa Cristina-CIBERehd; y Servicio de Medicina Digestiva (Unidad Experimental)^b, Hospital Universitario Doce de Octubre-CIBERehd, Madrid.

Introducción: El TGF- β juega un papel clave en el proceso de transdiferenciación (TDF) de las células estrelladas hepáticas (CEH) desde una CEH quiescente no fibrogénica a una CEH fibrogénica o miofibroblasto (MFB), interaccionando con el receptor tipo II, el cual activa al receptor tipo I (ALK1 o ALK5) que fosforila a un grupo de proteínas citoplásmicas, denominadas Smads, que transmiten la señal al núcleo activando la transcripción genética. El receptor ALK1 fosforila a Smad 1/5/8 y ALK5 a Smad2/3. Aún no está bien definida la cinética de las vías ALK1/ALK5 durante la TDF de las CEH.

Objetivo: Caracterizar las vías de señalización intracelular mediadas por TGF- β durante el proceso de TDF de las CEH.

Métodos: Se obtuvieron CEH de rata por el método de perfusión hepática con Pronasa-colagenasa seguido por ultracentrifugación en un gradiente de Larcoll. Las CEH se cultivaron en medio DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal. Se determinó la expresión de los receptores de TGF- β tipo I, II y III por citometría de flujo y Western blot (WB). Los complejos fosforilados (p) Smad 1/5/8 y Smad2/3 se analizaron por WB. Los experimentos se realizaron a diferentes tiempos del cultivo primario (2 y 9 días) y tras la 1ª (P1) y 3ª (P3) tripsinización. El grado de activación y la capacidad fibrogénica de las CEH se determinó por WB cuantificando la expresión de alfa-actina de músculo liso y del factor de crecimiento del tejido conectivo, respectivamente.

Resultados: Los receptores I y II se expresaban de manera uniforme a lo largo de la TDF, mientras que el receptor tipo III, endoglin, se inducía progresivamente durante la TDF. El complejo pSmad 1/5/8 se detectó intensamente en las CEH quiescentes (2 días), disminuyendo progresivamente hasta la fase de miofibroblasto (MFB). Por el contrario, el complejo pSmad 2/3 se detectaba débilmente en las CEH quiescentes, aumentando progresivamente hasta la fase de MFB. Un hecho interesante fue que el contenido de pSmad 2/3 au-

mentaba paralelamente con el grado de activación y diferenciación fibrogénica de las CEH.

Conclusiones: Las vías de señalización ALK1/pSmad1/5/8 y ALK5/pSmad2/3 presentan un perfil opuesto durante la TDF de las CEH. La vía TGF- β /ALK1 predomina en las CEH quiescentes, mientras que la vía TGF- β /ALK5 predomina en las CEH activadas y en los MFB, lo que sugiere que la inhibición o modulación de esta vía de señalización bloquearía o disminuiría la capacidad fibrogénica de las CEH.

BENEFICIO CLÍNICO DEL TRATAMIENTO ANTIVIRAL EN PACIENTES CON HEPATITIS C RECURRENTE TRAS EL TRASPLANTE HEPÁTICO

A. Palau,^{2,4} V. Aguilera^{1,4}, A. Rubín¹, M. Prieto^{1,4}, J.M. Rayón^{3,4}, F. San Juan⁶ y M. Berenguer^{1,4,5}

¹Servicio de Hepatogastroenterología Hospital la Fe, Valencia. ²Servicio de Hepatogastroenterología Hospital General Castellón. ³Servicio de Anatomía Patológica, Hospital la Fe, Valencia. ⁴Ciberehd. ⁵Profesor Asociado, Departamento de Medicina. Universidad de Valencia. ⁶Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático, Hospital la Fe, Valencia.

El tratamiento con interferón pegilado (pegIFN) y ribavirina erradica la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en un tercio de los pacientes trasplantados hepáticos con hepatitis C recurrente. El tratamiento no está exento de efectos adversos que pueden ser graves.

Objetivos: Definir el beneficio a largo plazo del tratamiento antiviral en la hepatitis C recurrente.

Métodos: 89 receptores de trasplante hepático (hombres 68,5%, edad: 58 (39-73) años; genotipo 1: 86,5%, tratados con IFN (n = 31) o pegIFN (n = 58) y ribavirina. La respuesta virológica sostenida (RVS) se obtuvo en 37% (IFN 16% vs peg-IFN 48%; p = 0,03). Se valoró la supervivencia del paciente, la progresión a cirrosis y la descompensación clínica desde el inicio del tratamiento. La supervivencia de los pacientes tratados fue comparada con un grupo control de pacientes trasplantados en el mismo periodo con hepatitis C recurrente no tratada.

Resultados: 18 pacientes murieron durante el seguimiento [3,3 años (1 mes-7,3 años)], 2/33 con RVS y 16/56 no respondedores (NR) (p = 0,01). Las causas de muerte fueron: recurrencia de la hepatitis C (56%), rechazo inducido por IFN (11%), ambas causas (11%), otras causas (22%). La supervivencia a los 5 años fue mayor en los pacientes con RVS que en los NR (93% vs 69%, p = 0,032). En pacientes sin cirrosis al inicio del tratamiento, la progresión a cirrosis ocurrió con mayor frecuencia en los NR (27/42 vs 6/16; p = 0,06). El riesgo de descompensación del injerto a los 5 años fue mayor en los NR (33% vs 16%; p = 0,04). La supervivencia fue mayor en los pacientes tratados que en el grupo control (Supervivencia al 7º año: 74% vs 62%; p = 0,04).

Conclusiones: La obtención de la RVS tras el tratamiento antiviral mejora la evolución a largo plazo de los pacientes trasplantados hepáticos con hepatitis C recurrente.