

COMUNICACIONES ORALES

XXXV Congreso Anual de la Fundación/Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 17-19 de febrero de 2010

Sesión general 1

Moderadores: *Fernando Casafont (Santander)*
y *Mercedes Iñarrairaegui (Pamplona)*

EL USO DE CICLOSPORINA EN EL RÉGIMEN INMUNOSUPRESOR SE ASOCIA CON UNA MAYOR RESPUESTA VIROLÓGICA SOSTENIDA Y UNA MEJORA HISTOLÓGICA AL FINAL DEL TRATAMIENTO CON INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA EN LA HEPATITIS C RECURRENTE

M. Navasa^a, T. Casanovas^b, M. Berenguer^c, I. Fernández^d, M. Salcedo^e, Ll. Castells^f, J.M. Pascasio^g, J.R. Fernández^h, I. Herreroⁱ, A. Otero^j, S. Tomé^k, M. de la Mata^l, R. Bärceña^m, I. Bañosⁿ y M. Guilera^ñ, en nombre del grupo de estudio ReViS-TC

^aHospital Clínico. Barcelona. España.

^bHospital de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat. España.

^cHospital La Fe. Valencia. España.

^dHospital 12 de Octubre. Madrid. España.

^eHospital Gregorio Marañón. Madrid. España.

^fHospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

^gHospital Virgen del Rocío. Sevilla. España.

^hHospital de Cruces. Bilbao. España.

ⁱClínica de Navarra. Pamplona. España.

^jHospital Juan Canalejo. A Coruña. España.

^kHospital Santiago. Santiago de Compostela. España.

^lHospital Reina Sofía. Córdoba. España.

^mHospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

ⁿHospital Puerta de Hierro. Madrid. España.

^ñNovartis. España.

Introducción: La influencia de la inmunosupresión en la respuesta al tratamiento antiviral (TAV) de la hepatitis C post trasplante, no está claramente definida.

Objetivos: Evaluar la influencia del tratamiento inmunosupresor (Ciclosporina (CsA) o Tacrolimus (Tac)) administrado durante el tratamiento con IFN-peg y Rib en la respuesta en pacientes con trasplante hepático y recurrencia de VHC.

Métodos: Estudio observacional, multicéntrico, retrospectivo. Se definió la respuesta viral sostenida (RVS) como mantenimiento de RNA indetectable 6 meses tras finalizar el TAV. Se realizó un análisis

de regresión logística para determinar las variables asociadas con la RVS.

Resultados: Se incluyeron 410 pacientes, 123 (30%) con CsA y 287 (70%) con tacrolimus (Tac). La edad media (DE) del receptor fue 54(10) años, con edad media del donante de 50 (18) años. Se observó RVS en el 48% de pacientes con CsA y 37% con Tac ($p = 0,037$). En el análisis multivariante, tras ajustar por carga viral pretratamiento, adherencia, diabetes, centro, edad del receptor, fibrosis pre-tratamiento, utilización de filgrastim y hepatitis aguda, la carga viral baja (odds ratio [OR] de 2,17, IC 95%: 1,19-3,96), administración de CsA (OR: 1,97 (1,12-3,47)) y una mayor duración del TAV (OR por cada mes 1,19 (1,10-1,30)) fueron factores predictivos de RVS. Una mayor edad del donante (OR por cada año 0,97 (0,96-0,98)) y el genotipo 1 (OR 0,15 (0,07-0,34)) se asociaron con menor probabilidad de RVS. En 157 pacientes se dispuso de biopsia antes y después del tratamiento antiviral. El porcentaje de mejora o estabilidad de la fibrosis fue significativamente superior en los pacientes con RVS frente a los no respondedores: 83,9% vs 57,9%, respectivamente ($p < 0,01$).

Conclusión: El uso de la CyA como inmunosupresor de base en los pacientes con hepatitis C post trasplante se asocia a una mayor RVS y ésta, a una mejoría histológica.

ESTRATEGIAS DE DIFERENCIACIÓN DE STEM CELLS DE GRASA HACIA PRECURSORES HEPÁTICOS

F.J. Martínez, N. Vicente-Salar, R. Francés, P. Zapater, E. Roche, J.A. Reig y J. Such

Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández. Elche. España.

CIBERehd-Unidad Hepática. Hospital General Universitario. Alicante. España.

Introducción: La dificultad creciente para la obtención de órganos dentro de los programas de trasplante hepático ha hecho valorar opciones como el implante de hepatocitos. Los avances en la investigación con células madre adultas mesenquimales de grasa (AMSC) permiten considerar la posibilidad de diferenciación de estas células de probada multipotencialidad hacia precursores hepáticos que podrían emplearse en diferentes patologías del hígado. El origen mesodérmico de estas células sugiere que debe realizarse un estudio previo para seleccionar dentro de la población de AMSC subpoblaciones con la potencialidad adecuada.

Objetivos: Estudio comparativo de los procesos de diferenciación in vitro de cultivos primarios heterogéneos de AMSC frente al experimentado por subpoblaciones clonales aisladas para una mejor selección de células con utilidad clínica.

Métodos: Se utilizaron dos fuentes de AMSC: lipoaspirados humanos y grasa inguinal de ratas Wistar. A partir de los cultivos primarios se purificaron posteriormente distintas subpoblaciones clonales expandidas a partir de una única célula. Se estudiaron más de diez clones individuales. Se evaluaron inicialmente dos procesos de diferenciación: Reprogramación mediante transporte de factores proteicos al interior celular mediante el péptido pep-1 (BioPorter®) y métodos coaxiales mediante medios definidos y factores de crecimiento.

Resultados: Se aislaron diferentes clones, tanto de células humanas como murinas. Los clones humanos mostraron diferente grado de expresión de marcadores genéticos mesodérmicos realizándose un estudio comparativo entre clones de baja y alta expresión de los transcritos analizados por RT-PCR. Los clones de baja expresión constitutiva mostraron comparativamente un alto grado de multipotencialidad hacia distintos linajes en medios definidos. Los controles iniciales de los procesos de diferenciación realizados utilizando el método de permeabilización mediante extractos proteicos y pep-1, resultaron poco concluyentes para realizar la reprogramación celular, por lo que en todos los casos la diferenciación se realizó por métodos coaxiales.

Conclusiones: La utilización de AMSC de grasa, resulta de gran interés en posibles tratamientos futuros de terapia celular en distintas patologías, incluyendo las hepáticas. Resulta de gran importancia el estudio de subpoblaciones para seleccionar aquellas con mayor potencial para diferenciar hacia el endodermo que permita la obtención de hepatocitos.

UN ÍNDICE DE FIBROSIS BASADO EN FIBROTAC Y FORNS MEJORA EL DIAGNÓSTICO NO INVASIVO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA SIGNIFICATIVA EN HEPATITIS C

R. Aparcero^a, E. Aranda^c, B. Martín^c, F. Ramos^b, C. Gómez^b, B. Pardo^a, L. Grande^a, R. Aznar^b, E. Gómez-González^c y M. Romero-Gómez^a

^aUnidad de Gestión Clínica de Enfermedades Digestivas y Ciberehd.
^bUnidad de Radiodiagnóstico.

^cGrupo de Física Interdisciplinar. ESI.

Universidad de Sevilla. Hospital Universitario de Valme. Sevilla. España.

Introducción: La fibrosis significativa (> F2) es indicación de tratamiento antiviral debido al impacto pronóstico. Los métodos no invasivos predicen fibrosis con gran seguridad pero los resultados en el diagnóstico de fibrosis significativa siguen siendo subóptimos.

Objetivos: Analizar el potencial del uso combinado de pruebas no invasivas en el diagnóstico de la fibrosis significativa en pacientes con hepatitis C.

Métodos: Incluimos una cohorte de estimación con 81 pacientes con ARNVHC positivo, 55 hombres y 26 mujeres; edad media de 42 + 10 años, de ellos 35 (43,2%) presentaban F0-F1, 19 (23,5%) F2 y 27 (33,3%) F3-F4. En la cohorte de validación incluimos 44 pacientes; edad media: 45 + 8 años, 31 hombres (70,5%). F0-F1: 17 (38,6%), F2: 10 (22,7%) y F3-F4: 17 (38,6%). Se valoró la fibrosis histológica utilizando la clasificación metavir. Determinamos el índice de Forn's y APRI y realizamos el análisis óptico de imágenes de TAC de hígado para calcular la distribución y el estadio de fibrosis (FibroTAC). En la cohorte de validación se realizó además el Fibroscan. Estudio estadístico: correlación de Spearman, curva ROC y análisis de regresión lineal múltiple.

Resultados: En la cohorte de estimación demostramos correlación entre fibrosis histológica y el índice de Forn's ($r = 0,51$; $p =$

$0,001$), FibroTAC ($r = 0,7$; $p = 0,0001$), APRI ($r = 0,48$; $p = 0,001$). En la regresión lineal múltiple demostramos que fibroTAC junto al índice de Forn's fueron variables independientes predictoras de fibrosis. Fibrosis = $0,617 + (0,526 \times \text{FibroTAC}) + (0,181 \times \text{Forn's})$. Este índice presenta un área bajo la curva AUC de 0,84 (IC95%: 0,76-0,93), para discriminar entre F1 y F2. En la cohorte de validación comprobamos una correlación entre el nuevo índice y la fibrosis (0,67; $p = 0,0001$). El índice fue diferente según los estadios de fibrosis (F0-F1: $1,95 + 0,5$ vs F2-F4: $2,85 + 0,68$; $p = 0,0001$). En el análisis de curva ROC el índice FibroTAC-Forn's fue superior al Fibroscan en el diagnóstico de fibrosis significativa (AUC F0-F1 vs F2-F4: $0,88$ vs $0,77$; $p = \text{ns}$). En cambio, el Fibroscan fue superior en el diagnóstico de cirrosis (AUC $0,98$ vs $0,90$; $p = \text{ns}$).

Conclusiones: El uso conjunto del Fibro TAC y el índice de Forn's permite diagnosticar fibrosis significativa con alta seguridad diagnóstica mientras que el fibroscan confirma de forma segura la presencia de cirrosis.

IDENTIFICACIÓN DE MICROARN POTENCIALMENTE ONCOGÉNICOS EN UNA SUBCLASE MOLECULAR DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

C. Alsinet^a, V. Tovar^a, S. Toffanin^{b,c}, A. Lachenmayer^b, Y. Hoshida^d, L. Cabellos^b, L. Jun^d, A. Villanueva^a, D. Chiang^d, B. Mínguez^b, S. Radoslav^b, S. Roayaie^b, M.E. Schwartz^b, V. Mazzaferro^c, S. Waxman^b, J. Bruix^a, S.L. Friedman^b, T. Golub^b y J.M. Llovet^{a,b}

^aLaboratori de Recerca Transnacional en Oncologia Hepàtica. BCLC. CIBERehd. Hospital Clínic. IDIBAPS. Barcelona. España.

^bMount Sinai. New York. NY. EE.UU.

^cNational Cancer Institute. Milán. Italia.

^dCancer Program. Broad Institute. Cambridge. MA. EE.UU.

Introducción: Las bases moleculares del desarrollo del carcinoma hepatocelular (CHC) son poco conocidas. Los microARN (miARN) son pequeños ARN no codificantes que parecen estar implicados en la patogenia de múltiples cánceres y en su clasificación molecular.

Objetivos: a) establecer una clasificación molecular de CHC basada en miARN, y b) explorar el papel de miARN potencialmente oncogénicos en modelos de CHC.

Métodos: La expresión de 358 miARN se obtuvo mediante amplificación dependiente de ligación en 89 muestras de CHC en estadios iniciales y se integraron con un análisis genómico que incluye expresión génica (Affymetrix U133 2.0[®]), SNP array (Affymetrix STY Mapping Array[®]), inmunohistoquímica (p Akt, p IGF IR, p S6, p EGFR, β catenina) y análisis mutacional (β catenina). La expresión de miARN se validó por PCR cuantitativa en una cohorte independiente ($n = 167$). Se definieron las subclases moleculares con Subclass mapping. Los mecanismos genéticos y epigenéticos de desregulación de los miARN se evaluaron por PCR, FISH y SNP array específicos de metilación. El papel oncogénico de los miARN se evaluó mediante incorporación de timidina, migración e invasión en líneas celulares de CHC.

Resultados: La integración de la expresión de miARN y el análisis genómico definió 3 clases moleculares, caracterizadas por la activación de diferentes vías de señalización: Wnt signalling (32/89, 36%), IFN-response related genes (29/89, 33%) y Proliferation (IGF, Akt/mTOR) (28/89, 31%). Se identificó una sobreexpresión singular de un cluster de 20 miARN (mediana: 8,8 veces) localizados en 19q13.42, que caracteriza un subgrupo dentro de la clase Proliferation (8/89, 9%). Este resultado se validó en una cohorte independiente (17/167, 10,2%). Los mecanismos de sobreexpresión fueron la hipermetilación de promotores en CpG (2/8, 25%) y el aumento del número de copias de ADN (1/8, 12,5%) de esta región. Este subgrupo de tumores con sobreexpresión de miARN de 19q tiene un perfil de expresión génica similar ($p < 0,008$). La transfección de dos miARN en células Huh7 aumentó la proliferación ($p < 0,05$),

migración ($p < 0,02$) e invasión ($p < 0,05$), sugiriendo su capacidad oncogénica.

Conclusiones: Se identificó un subgrupo de pacientes de CHC caracterizado por la sobreexpresión de miARN de 19q y la activación de vías de proliferación. La sobreexpresión de estos miARN induce proliferación, migración e invasión in vitro, apuntando a su papel oncogénico. Actualmente se evalúa esta hipótesis in vivo.

LA ELIMINACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA 12/15-LIPOOXIGENASA PROTEGE A RATONES HIPERLIPIDÉMICOS DEL DESARROLLO DE ESTEATOHEPATITIS

M. Martínez-Clemente, N. Ferré, M. López-Parra, R. Horrillo, A. González-Pérez, E. Titos, E. Morán-Salvador, R. Miquel, V. Arroyo, C.D. Funk y J. Clària

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Servicio de Anatomía Patológica. Unidad de Hígado. Hospital Clinic. IDIBAPS. CIBEK. CIBERehd. Universitat de Barcelona. Barcelona. España. Queen's University. Kingston. Canadá.

Introducción: La enfermedad del hígado graso no alcohólica es una patología asociada a la obesidad y resistencia a la insulina, y frecuentemente coexiste con otras alteraciones metabólicas como la hiperlipidemia. Estudios recientes han demostrado que ratones hiperlipidémicos por deficiencia en el gen de la apolipoproteína E (ratones ApoE^{-/-}) presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de esteatohepatitis. Aunque se desconoce el mecanismo responsable, se ha descrito que entre los genes sobreexpresados en el hígado de ratones ApoE^{-/-} se halla la 12/15-lipooxigenasa (12/15-LO), una enzima proinflamatoria de la cascada del ácido araquidónico que participa en la oxidación de lipoproteínas.

Objetivos: Dado que la deficiencia en 12/15-LO ha demostrado un efecto protector sobre el sistema cardiovascular en ratones ApoE^{-/-}, en el presente estudio investigamos si la deficiencia en 12/15-LO también ejerce efectos protectores sobre el hígado. Diseño del estudio: ratones control (n = 16), ratones ApoE^{-/-} (n = 12) y ratones doble knockout para la ApoE y la 12/15-LO (ApoE^{-/-}/12/15-LO^{-/-}) (n = 16) se estudiaron en condiciones basales y tras recibir una dieta rica en grasa.

Resultados: En comparación con el grupo control, los ratones ApoE^{-/-} presentaron un mayor grado de lesión hepática, reflejado por la presencia de esteatosis e inflamación y un aumento de la infiltración de macrófagos y de la expresión de MCP-1, TNF-alfa, IL-6 y IL-18 en el tejido hepático. La deficiencia de la 12/15-LO en ratones ApoE^{-/-} disminuyó significativamente la esteatosis, la inflamación, la infiltración de macrófagos y la expresión de MCP-1, TNF-alfa, IL-6 y IL-18 en el tejido hepático. Además los ratones ApoE^{-/-}/12/15-LO^{-/-} presentaron una menor inducción de FASN, una menor actividad de la JNK y un aumento de la expresión de IRS-2 en el hígado, indicativo de una mejoría en la resistencia hepática a la insulina. Los efectos sobre el metabolismo de carbohidratos fueron más evidentes tras recibir una dieta rica en grasa, ya que se produjo una normalización en el test de tolerancia a la insulina y el contenido hepático de glicógeno en los ratones ApoE^{-/-}/12/15-LO^{-/-}. Por último, se observó una menor tinción de la caspasa-3 en el hígado de ratones ApoE^{-/-}/12/15-LO^{-/-}, a la vez que sus hepatocitos aislados presentaron una menor vulnerabilidad a la apoptosis inducida por el TNF-alfa.

Conclusiones: Estos resultados indican que la 12/15-LO juega un papel patogénico relevante en la enfermedad hepática de origen metabólico.

RELEVANCIA DEL POLIMORFISMO FUNCIONAL DE LA MANGANESO SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD2 VAL16ALA) Y DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA1 (GPX1 PRO200LEU) EN PACIENTES CON DAÑO HEPÁTICO IDIOSINCRÁSICO INDUCIDO POR MEDICAMENTOS (DILI)

R.J. Andrade^{a,c}, C. Martínez^{b,d}, E. Ulzurrun^{a,c}, E. García-Martín^{b,e}, C. Stephens^{a,c}, G. Peláez^f, M. Romero-Gómez^{a,g}, A. Castiella^h, R. Planasⁱ, C. Guarner^{a,j}, G. Soriano^{a,j}, Y. Borraz^{a,c}, M.I. Lucena^{a,c} y J.A. Agundez^{b,d}

^aCentro de Investigación Biomédica en Red: Enfermedades Hepáticas y Digestivas CIBERehd.

^bCentro de Investigación Biomédica en Red: Reacciones Adversas a Alergenos y Fármacos (RIRAAF).

Unidades de Hepatología y Farmacología Clínica:

^cHospital Virgen de la Victoria. Facultad de Medicina. Málaga. España.

^dDepartamento de Farmacología. Facultad de Medicina.

^eDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.

^fHospital Torrecárdenas. Almería. España.

^gHospital Nuestra Señora de Valme. Sevilla. España.

^hHospital Mendaró. Guipúzcoa. España.

ⁱHospital Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España.

^jHospital de Sant Pau. Barcelona. España.

Introducción: La enzima Manganese Superóxido Dismutasa (SOD2) y la Glutatión Peroxidasa (GPX1) son importantes "scavengers" del ROS mitocondrial. La variante polimórfica de la SOD2 Val16Ala, facilita el transporte de la preproteína al interior mitocondrial y la variante polimórfica de la GPX1 Pro200Leu produce una disminución de la actividad enzimática. Aims: Evaluar la posible asociación de los polimorfismos de SOD2 Val16Ala y de la GPX1 Pro200Leu con el riesgo de desarrollar DILI.

Pacientes y métodos: El análisis fue de 185 pacientes con DILI, evaluados por la escala de CIOMS, y 270 controles emparejados por edad y género. El genotipado de SOD2 y de GPX1 se realizó mediante la técnica PCR-RFLP y qPCR con sondas Taqman respectivamente. El poder estadístico para detectar el efecto de las variantes alélicas con un OR observado fue del 98,2% y del 99,7% para la asociación bilateral de SOD2 y GPX1 respectivamente.

Resultados: El genotipo SOD2 Ala/Ala se asoció con un incremento del riesgo de DILI para el daño colestásico/mixto (OR = 2,3; IC95% = 1,4-3,8; Pc = 0,0058). Mientras que el genotipo Leu/Leu GPX1 se asoció a un daño colestásico (OR = 5,1; 1,6-16,0; Pc = 0,0112). La combinación de dos o más alelos de riesgo (SOD2 Ala y GPX1 Leu) fue significativamente más frecuente en los pacientes DILI que en los controles (OR = 2,1; 1,4-3,0; Pc = 0,0006). Los pacientes que exhibieron daño hepático colestásico/mixto inducido por fármacos con toxicidad potencial a nivel mitocondrial tenían con mayor frecuencia el genotipo Ala/Ala (OR = 3,6; 1,4-9,3; Pc = 0,02). Este genotipo también fue más frecuente en los casos DILI con daño colestásico/mixto inducidos por fármacos que generan intermediarios quinonas o epóxidos (n = 58) (OR = 3,0; 1,7-5,5, Pc = 0,0008) y los S-óxidos, diazenos, los radicales introañión y los iones iminio (n = 5) (OR = 16,0; 1,8-146,1; Pc = 0,009). La población control presentó diferencias significativas en la distribución de los genotipos SOD2 y GPX comparada con otras etnias.

Conclusiones: Nuestros datos muestran que los pacientes homocigotos para el alelo Ala de SOD2 y para el alelo Leu de GPX1 tienen un mayor riesgo de desarrollar daño hepático colestásico inducido por fármacos. Pacientes SOD2 Ala homocigotos son más propensos a desarrollar DILI por fármacos que exhiben toxicidad mitocondrial o generan intermediarios reactivos.

Financiación: Agencia española del medicamento, SAS PI-0082/2007 y FUNDESALUD. CIBERehd and RIRAAF son financiados por el ISC III.

LA DISFUNCIÓN CIRCULATORIA SISTÉMICA DE LA CIRROSIS SE ASOCIA A UN INCREMENTO DE LA CONTRACTILIDAD CARDÍACA

C. Ripoll^a, R. Yotti^b, D. Rincón^a, M. Puerto^a, Y. Benito^b, M.V. Catalina^a, M. Alhama^b, M. Salcedo^a, J. Bermejo^b y R. Bañares^a

^aUnidad de Hepatología y Trasplante Hepático. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. CIBEREHD. Madrid. España.

^bCardiología no Invasiva. Servicio de Cardiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

Introducción: La miocardiopatía del cirrótico se ha asociado a disfunción circulatoria y síndrome hepatorenal (SHR), si bien la evidencia es escasa. Los índices ecocardiográficos (ECOC) son difíciles de interpretar cuando hay cambios en la carga. Se ha descrito un parámetro ECOC de contractilidad, el gradiente sistólico pico de presión intraventricular (GSPIV), independiente de la pre y postcarga.

Objetivos: Evaluar la función cardíaca en pacientes candidatos a trasplante hepático mediante ECOC, incluyendo el GSPIV, y su relación con el grado de hipertensión portal y las anomalías circulatorias de la cirrosis.

Métodos: Se incluyeron pacientes en evaluación pretrasplante salvo aquellos con enfermedad cardíaca, diabetes mellitus, trombosis portal, con DPPI, Child-Pugh > 12 o en profilaxis secundaria con betabloqueantes. Recibieron dieta hiposódica y se retiraron los

diuréticos y betabloqueantes durante 5 días. Se realizó ECG de 24 horas y prueba de esfuerzo y luego un cateterismo hepático y cardíaco derecho con ECOC simultáneo, en el que se determinaron las medidas convencionales y el GSPIV (mayor GSPIV, mayor contractilidad). Se midieron los niveles de NA, renina, aldosterona, NO, BNP y TNF alfa. Los datos ECOC se compararon con un grupo control apareado. Los datos se expresan como medianas (rango).

Resultados: Se incluyeron 11 pacientes (MELD: 13,6 (8,9-18,4), Child A: 2, B: 8, C: 1). El GSPIV fue mayor en cirróticos (5,42 (2,31-8,67) mmHg vs 2,84 (1,77-3,79) mmHg) ($p < 0,001$). Existió una correlación entre el GSPIV con la puntuación de Child ($r = 0,81$, $p = 0,003$), MELD ($r = 0,68$, $p = 0,02$) y la creatinina ($r = 0,61$, $p = 0,047$). Asimismo existió una correlación positiva del GSPIV con la activación neurohormonal (renina ($r = 0,65$, $p = 0,04$); aldosterona ($r = 0,67$, $p = 0,02$)), y negativa con la variabilidad de la frecuencia cardíaca (disfunción autonómica) ($r = -0,71$, $p = 0,047$). No hubo asociación con parámetros de hemodinámica hepática ni del cateterismo cardíaco derecho. Los pacientes con ascitis presentaban un GSPIV superior (6,55 (4,02-8,67) mmHg vs 3,96 (2,31-6,42) mmHg) ($p < 0,001$).

Conclusiones: Estos datos sugieren que los pacientes con mayor disfunción circulatoria tienen un aumento de la contractilidad. Posiblemente, debido al uso de la mayor parte de su reserva contráctil, éstos pueden encontrarse en riesgo de desarrollar SHR en circunstancias de mayor estrés. La medida del GSPIV puede aportar información en el estudio de la función cardíaca en la cirrosis.



COMUNICACIONES ORALES

XXXV Congreso Anual de la Fundación/Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 17-19 de febrero de 2010

Sesión general 2

Moderadores: Javier Fernández-Castroagudín (Santiago de Compostela) y Cristina Ripoll (Madrid)

LA EVALUACIÓN DE LA PERFUSIÓN TUMORAL POR MEDIO DE TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA DETECTA PRECOZMENTE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO Y PREDICE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN PACIENTES CON CARCINOMA HEPATOCELULAR AVANZADO TRATADOS CON SORAFENIB

M. Reig^a, J. Rimola^b, A. Forner^a, C. Rodríguez de Lope^a, S. Tremosini^a, Cayuso^b, J.M. Llovet^a y J. Bruix^a

^aBCLC. Unidad de Hepatología. Hospital Clínic. IDIBAPS. CIBEREHD. Barcelona. España.

^bBCLC. Departamento de Radiología. Hospital Clínic. CIBEREHD. Barcelona, España.

Introducción: Sorafenib mejora la supervivencia en pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado (CHC) a través de un retraso en la progresión tumoral, a pesar de la ausencia de la reducción de la carga tumoral. Por este motivo, los criterios de respuesta basados en el cambio del tamaño tumoral son inadecuados para la valoración de la eficacia terapéutica del sorafenib y debido a su eficacia antiangiogénica su impacto a nivel tumoral debería inducir cambios de la perfusión tumoral medida mediante TC.

Objetivo: Evaluar prospectivamente los cambios en la vascularización tumoral mediante la técnica de perfusión por TC (P-TC) y establecer su relación con la tasa de progresión del tumor durante el seguimiento.

Métodos: Todos los pacientes con CHC candidatos a sorafenib entre octubre 2007 a enero 2009 que presentaban una lesión diana no tratada fueron reclutados para el estudio. Se realizó control clínico y analítico mensual y una P-TC (Siemens Sensation, Erlagen, Alemania) basal, a las 4 y 12 semanas del inicio del tratamiento. Se registraron los siguientes parámetros relacionados con la angiogénesis: flujo de perfusión (FP), volumen sanguíneo (BV) (que reflejan el paso de contraste intravascular al espacio intratumoral), y permeabilidad de la perfusión (PP) (que refleja la perfusión tisular en el tumor, pero necesita más tiempo de adquisición). La progresión del tumor (TP) y la respuesta a sorafenib se evaluó por medio de los criterios RECIST modificados (Llovet et al. JNCI 2008). Los valores

basales, los cambios post tratamiento en la P-CT se correlacionaron con el tiempo a progresión del CHC.

Resultados: Se han incluido 24 pacientes con CHC tratados durante una mediana de 11,9 (3,6-23,9) meses, y con una supervivencia mediana de 13,8 meses (11,1-16,5). Todos, excepto un paciente presentaban cirrosis (46% VHC +), la mediana de edad fue de 67 años [49-78], 92% varones, 88% Child-Pugh A, BCLC-B en 17 y C en 7. La mediana del tiempo hasta la progresión (TTP) fue 5,9 meses (IC95%: 2,3 a 9,5) y 12 pacientes presentaron PT a los 6 meses. Las características clínicas basales fueron similares ambos grupos (PT y noPT): Sin embargo, el grupo PT presentó valores basales de BV y FP significativamente mayores que el grupo noPT ($p = 0,02$); BV: 15,8 vs 10,1 ml/mg y FP: 45,3 vs 27,9 ml/100 mg/min, respectivamente. Todos los parámetros de P-TC a las 4 y 12 semanas se redujeron con respecto al basal en los pacientes noPT alcanzando significación estadística a las 12 semanas: FP: 27,9 a 14,7 ml/100 mg/min ($p = 0,0017$); BV: 10,1 a 5,6 ml/mg ($p = 0,005$), y PP: 36,5 a 21,7 ml/100 mg/min ($p = 0,001$). Por el contrario, ninguno de los parámetros se modificó en los pacientes con PT.

Conclusiones: El tratamiento con sorafenib induce cambios en la perfusión tumoral detectables mediante P-CT y su magnitud se correlaciona con la evolución del tumor. Por tanto, la medición de FP, BV y PP por P-TC puede constituir una herramienta sensible para establecer la eficacia de sorafenib y para detectar su fracaso antes de la aparición de progresión tumoral evidente.

REPROGRAMACIÓN DE HEPATOCITOS DE RATÓN PARA LA GENERACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS (IPS)

B. Anangi, A. Porciuncula, M. Barajas, F. Prosper, J. Prieto y R. Aldabe

CIMA. Universidad de Navarra. Pamplona. España.

Introducción: Recientemente se ha demostrado que la simple expresión de 4 factores de transcripción (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) en células diferenciadas adultas es suficiente para reprogramarlas y que adquieran características de células embrionarias pluripotentes. Esto abre la posibilidad de posteriormente diferenciarlas en los diferentes tipos celulares presentes en el hígado.

Métodos: Se aislaron hepatocitos de ratón y se infectaron con cuatro retrovirus diferentes que expresan los cuatro factores de

transcripción anteriormente mencionados y tras 2-3 semanas se aislaron diversos clones de células con una morfología similar a las células madre embrionarias (ES). Estas clones se caracterizaron mediante RT-PCR, inmunofluorescencia y diferenciación espontánea e inducida para comprobar su capacidad pluripotencial para generar diferentes tipos celulares.

Resultados: Cuando se sobreexpresan los factores de transcripción OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC en hepatocitos de ratón se consigue reprogramar las células generando una serie de clones con morfología similar a las células ES murinas. Este proceso es más eficiente si se elimina el factor c-MYC, pero son necesarios las otras tres proteínas para conseguir una reprogramación de los hepatocitos murinos. Los clones aislados expresan altos niveles de varios factores presentes en células madre embrionarias como OCT3/4, NANOG y FBX15 cuando se analizan mediante RT-PCR. De igual manera al analizar mediante inmunofluorescencia la expresión de las proteínas NANOG, OCT4 y SSEA1 se comprueba que presentan una expresión similar a la encontrada en células madre embrionarias de ratón. Continuando con el análisis de los clones aislados comprobamos que presentaban otras características presentes en las células ES como es la expresión de la proteína fosfatasa alcalina. La prueba final de su capacidad pluripotente la comprobamos al detectar la generación de células correspondientes a los tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) cuando se analizaba la diferenciación espontánea de estas células cuando al crecerlas formando cuerpos embrionarios.

Conclusiones: Los hepatocitos de ratón pueden reprogramarse para generar células madre pluripotentes de una manera eficiente y reproducible. Esto abre la posibilidad de generar in vitro cualquier tipo celular presente en el hígado que puede utilizarse posteriormente para el estudio de diferentes procesos biológicos hepáticos así como en diferentes tipos de terapia celular.

IMPACTO DE LA OBESIDAD SOBRE LA HISTORIA NATURAL Y EL DESARROLLO DE DESCOMPENSACIÓN EN PACIENTES CON CIRROSIS COMPENSADA

A. Berzigotti^{a,b}, G. García-Tsao^{c,d}, J. Bosch^{a,b}, N. Grace^e, A. Burroughs^f, R. Planas^g, A. Escorsell^{a,b}, J.C. García-Pagán^{a,b}, D. Patch^f, D.S. Matloff^e, R.J. Groszmann^{c,d} y el Portal Hypertension Collaborative Group

^aLiver Unit. Hospital Clínic. Barcelona. España.

^bCIBERehd. Barcelona. España.

^cDigestive Diseases Section. Yale University School of Medicine. New Haven. CT. EE.UU.

^dDigestive Diseases Section. VA-CT Healthcare System. West Haven. CT. EE.UU.

^eBrigham and Women's Hospital. Boston. Massachusetts. EE.UU.

^fRoyal Free Hospital and School of Medicine. London. Reino Unido.

^gHospital Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España.

Introducción: En pacientes con cirrosis compensada, el gradiente de presión venosa hepática (GPVH), la albúmina y el MELD son predictores independientes de descompensación. La supervivencia de pacientes con cirrosis debida a NASH y obesidad es inferior a la de los con cirrosis por VHC, lo que sugiere que la obesidad pueda empeorar la historia natural de la cirrosis.

Objetivos: Estudiar el efecto de la obesidad sobre el desarrollo de descompensación en pacientes con cirrosis compensada.

Métodos: Se incluyeron 123 cirróticos compensados sin varices esofágicas de entre los incluidos en un ensayo clínico sobre el uso de timolol para la prevención de las varices de los que se disponía de peso y talla al inicio para calcular el índice de masa corporal (IMC). Todos recibieron un seguimiento hasta la aparición de descompensación, la muerte o el fin del estudio (09/2002). Se midió el GPVH a la inclusión y al año de follow-up en 97 casos. La variable

en estudio fue el desarrollo de descompensación, definida como aparición de ascitis, encefalopatía o hemorragia por varices.

Resultados: De los 123 pacientes, 30 (24%) tenían un IMC normal (BMI 18,5-25), 54 (44%) estaban sobrepeso (BMI 25-29,9) y 39 (32%) eran obesos (BMI > 30). Los obesos presentaban una mayor prevalencia de cirrosis alcohólica, un MELD más elevado y unas transaminasas más bajas con respecto a los otros pacientes. En el seguimiento (mediana 59 meses, rango 1-109), 31 (25%) desarrollaron descompensación (ascitis 64%, encefalopatía 35%, hemorragia por varices 6%). Esta fue más frecuente en los pacientes obesos (normales 13%, sobrepeso 20% y obesos 41%, p = 0,018). La probabilidad de desarrollar descompensación (Kaplan-Meier) fue significativamente mayor en los pacientes obesos. En el análisis multivariado (regresión de Cox) los predictores independientes de descompensación fueron GPVH [HR: 1,12 (95%CI 1,05-1,21)]; albúmina [HR 0,37 (0,17-0,81)] y obesidad [HR 3,21 (1,56-6,60)]. El MELD, la etiología y el grupo de tratamiento no fueron predictores independientes del riesgo de descompensación.

Conclusiones: La obesidad aumenta de manera independiente el riesgo de descompensación en pacientes con cirrosis compensada de cualquier etiología, por lo que debe considerarse perjudicial. Ello sugiere que la disminución del peso corporal podría ser una medida terapéutica importante para disminuir el riesgo de descompensación en pacientes obesos.

EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) PROMUEVE LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS HUMANAS (CEHHs)

S. Martín Vélchez^a, Y. Rodríguez Muñoz^a, R. López-Rodríguez^a, A. Hernández-Bartolomé^a, P. Majano Rodríguez^a, F. Molina Jiménez^a, R. Aldabe^b, R. Moreno-Otero^a y P. Sanz Cameno^a

^aUnidad de Hepatología. Hospital Universitario La Princesa y CIBERehd. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

^bCIMA. Universidad de Navarra. Pamplona. España.

Introducción: El virus de la hepatitis C (VHC) promueve la migración de las células estrelladas hepáticas humanas (CEHHs). Introducción: La infección crónica por VHC es una de las principales causas de hepatitis, cirrosis y hepatocarcinoma, sin embargo los mecanismos por los cuales el VHC es capaz de inducir fibrosis no están claros. Tras un daño hepático crónico las CEHHs alcanzan un estado sostenido de activación que se manifiesta por la adquisición de ciertas propiedades siendo una de ellas la migración, permitiendo a las CEHHs acumularse en las zonas de lesión.

Objetivos: Determinar si el VHC es un estímulo quimiotáctico para las CEHHs y modular su migración.

Materiales y métodos: Mediante ensayos de "transwells" incubados con medios condicionados de replicones subgenómicos de VHC, generados a partir de la línea Huh-7, estudiamos el efecto quimiotáctico del VHC sobre las CEHHs. Los "transwells" fueron tapizados con una matriz de colágeno, sobre la que sembramos las CEHHs, los medios condicionados por los replicones, clones 5 (C5) y 7 (C7), se depositaron en los pocillos de la placa. Tras 24h de incubación, retiramos la matriz de colágeno y teñimos con DAPI las membranas de los "transwells". Mediante microscopio de fluorescencia, determinamos el número de CEHHs. Los medios 10% y 0% de suero fueron tomados como controles positivo y negativo, respectivamente. Los medios Huh-7 sirvieron como control negativo respecto a los medios de C5 y C7.

Resultados: La tinción de las membranas incubadas con medios C5 y C7 mostraron una mayor cantidad de núcleos de CEHHs en comparación con aquellas provenientes de "transwells" incubados con medios de Huh-7 y 0% suero. Esto indica que los medios de los replicones son capaces de inducir la migración de las CEHHs a través de la matriz de colágeno, hasta la membrana del transwell. Por

el contrario, el reducido número de núcleos detectados en las membranas incubadas con medios de Huh-7 y 0% suero indican que la mayor parte de las CEHHs no han sido capaces de migrar. Los numerosos núcleos en las membranas estimuladas con medio 10% suero demuestran la necesaria activación de las CEHHs para adquirir capacidad migratoria.

Conclusiones: Los datos muestran que el VHC es capaz, directamente o a través de factores solubles, de activar las CEHHs y provocar su migración. Este efecto quimiotáctico del VHC contribuiría no sólo al reclutamiento de las CEHHs a las áreas de lesión, sino también a la invasión por parte de las CEHHs de zonas periféricas al área lesionada, pudiendo amplificar así el avance y progreso de la fibrosis.

RELACIÓN ENTRE LOS CAMBIOS EN LA PRESIÓN PORTAL EN PACIENTES CON CIRROSIS COMPENSADA Y EL DESARROLLO DE ASCITIS

V. Hernández-Gea^a, I. Graupera^a, C. Aracil^b, A. Colomo^a, M. Concepción^a, M. Poca^a, X. Torras^a, C. Guarner^a y C. Villanueva^a

^aUnidad de Sangrantes. Servicio de Digestivo. Hospital de Sant Pau. Barcelona. España.

^bServicio de Digestivo. Hospital Arnau de Vilanova. Lleida. España.

Introducción: La hipertensión portal (HTP) es responsable de severas complicaciones en la cirrosis, incluyendo la ascitis, para cuyo desarrollo es necesario un gradiente de presión portal (GPP) > 10 mmHg. Por encima de este valor no está bien establecida la relación entre los cambios en el GPP y la aparición de ascitis. Se ha sugerido que un descenso del GPP > 20% puede mejorar el control de la ascitis, aunque se han reportado datos contradictorios. Tampoco se ha evaluado si los cambios del GPP inducidos por los beta-bloqueantes (BB) pueden prevenir la aparición de ascitis en la cirrosis compensada, ni que factores pueden predecirla.

Objetivos: Evaluar la relación entre los cambios en el GPP inducidos por BB y el desarrollo de ascitis, en pacientes con cirrosis compensada, HTP severa y sin historia previa de ascitis y evaluar otros factores predictivos de ascitis en estos pacientes.

Métodos: Se incluyó a pacientes cirróticos con varices grandes y sin historia previa de ascitis o hemorragia. Se realizó una hemodinámica basal y se evaluó la respuesta hemodinámica aguda a BB. Posteriormente se inició tratamiento crónico con BB y se repitió una 2ª hemodinámica 1-3 m después. Los pacientes fueron visitados cada 4 m.

Resultados: Durante un seguimiento medio de 49 ± 38 m se incluyeron 83 pacientes. 49 (59%) desarrollaron ascitis, 14 (17%) sangraron y 24 (29%) murieron. Las curvas ROC demostraron que los cambios del GPP con la administración aguda y crónica de BB tienen capacidad predictiva de ascitis (AUC, 0,74 y 0,82 respectivamente). Un descenso del GPP $\geq 10\%$ fue el mejor punto de corte para predecir ascitis. El riesgo de desarrollar ascitis fue mayor en pacientes con reducción del GPP < 10% vs aquellos con descenso mayor ($p < 0,01$), tanto en el estudio agudo como en el crónico. El riesgo de desarrollar s. hepatorenal también fue superior en los pacientes con descenso del GPP < 10% ($p < 0,01$). El descenso del GPP < 10%, y en condiciones basales el MELD, el filtrado glomerular y las resistencias vasculares sistémicas se asociaron con mayor riesgo de desarrollar ascitis. El análisis CART identificó como factores predictores de ascitis al descenso de GPP y el MELD.

Conclusiones: En pacientes con cirrosis compensada e HTP severa en profilaxis primaria con BB, un descenso del GPP > 10% se asocia con una menor probabilidad de desarrollar ascitis y síndrome hepatorenal. La evaluación de la respuesta aguda al tratamiento BB proporciona información pronóstica de la probabilidad de desarrollar ascitis a largo plazo.

LA RESISTENCIA HEPÁTICA A LA INSULINA CONTRIBUYE A LA APOPTOSIS HEPATOCITARIA Y FIBROGENESIS EN LA ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA Y EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

C. García Monzón^{a,e}, O. Lo Iacono^b, R. Mayoral Moñibas^{c,e}, A. González Rodríguez^{c,f}, M.E. Miquilena Colina^{a,e}, T. Lozano Rodríguez^{a,e}, L. García Pozo^{a,e}, J. Vargas Castrillón^{a,e}, M. Casado Pinna^{d,e}, L. Boscá Gomar^{c,e}, A.M. Valverde^{c,f} y P. Martín-Sanz^{c,e}

^aUnidad de Investigación. Hospital Universitario Santa Cristina. Madrid. España.

^bServicio de Aparato Digestivo. Hospital del Tajo. Aranjuez. Madrid. España.

^cInstituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

^dInstituto de Biomedicina de Valencia. Valencia. España.

^eCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). España.

^fCentro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM). España.

Introducción: La resistencia a la insulina (RI) es frecuente en el hígado graso no alcohólico (HGNA) y en la infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), pero se desconoce el grado de alteración de la señalización de la insulina en el hígado de estos pacientes y su impacto patogénico en ambas patologías.

Objetivos: a) determinar la expresión intrahepática de diferentes dianas de la insulina (DI) y su relación con apoptosis y fibrogenesis, y b) analizar el efecto del VHC y de la sobrecarga lipídica en la vía de señalización de la insulina.

Métodos: Se estudiaron 32 pacientes con HGNA (20 con esteatosis, 12 con esteatohepatitis), 40 con VHC y 22 con hígado normal. Se determinó la expresión intrahepática del substrato del receptor de la insulina (SRI)-1, SRI-2, p85alfa, fosfo-Akt y fosfo-Foxo1 por qPCR y Western blot (WB). Para evaluar apoptosis, se utilizó la técnica TUNEL y se cuantificó la expresión intrahepática de los mediadores anti-apoptóticos Bcl-2 y Mcl-1 por qPCR y WB así como de caspasa 3 activa por WB. Como marcador de fibrogenesis, se cuantificó la expresión intrahepática del colágeno alfa1 por qPCR. Por otro lado, analizamos la respuesta a la insulina en hepatocitos humanos transfectados con la proteína core del VHC y cultivados en presencia o no de ácido esteárico, cuantificando fosfo-Akt, fosfo-SRI-1307 y fosfo-JNK por WB.

Resultados: La expresión intrahepática, tanto a nivel de ARNm como de proteína, de las DI y de Bcl-2 y Mcl-1 fue significativamente inferior en la esteatohepatitis que en la esteatosis y en el hígado normal. Asimismo, sólo se evidenció apoptosis hepatocitaria y aumento de caspasa 3 activa en la esteatohepatitis. En los pacientes VHC+, la expresión intrahepática de las DI así como de Bcl-2 y Mcl-1 estaba marcadamente disminuida en paralelo con un aumento de caspasa 3 activa y de hepatocitos apoptóticos. Tanto en HGNA como en VHC, la expresión intrahepática del SRI-1 se correlacionaba significativamente con la de Bcl-2, Mcl-1 y colágeno alfa1. Los hepatocitos transfectados estimulados con insulina tenían menos fosfo-Akt y más fosfo-SRI-1307 y fosfo-JNK que los controles, siendo este efecto más pronunciado en condiciones de sobrecarga lipídica.

Conclusiones: La resistencia hepática a la insulina contribuye a la apoptosis hepatocitaria y a la fibrogenesis en pacientes con HGNA y con VHC. El incremento de fosfo-JNK en los hepatocitos podría ser uno de los mecanismos moleculares de la RI inducida por el VHC.

LA APELINA (AP) MEDIA LA INDUCCIÓN DE VÍAS PROFIBROGÉNICAS ACTIVADAS POR ANGIOTENSINA II (AII) Y ENDOTELINA 1 (ET-1) EN LAS CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS (CEH) HUMANAS

P. Melgar-Lesmes^a, G. Casals^a, M. Pauta^a, J. Ros^a, V. Reichenbach^a, R. Bataller^b, M. Morales-Ruiz^a y W. Jiménez^a

^aServicio de Bioquímica y Genética Molecular.

^bUnidad de Hepatología-Institut de Malalties Digestives.

Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. IDIBAPS. CIBERehd. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

Introducción: La AP es un péptido proangiogénico cuyos niveles circulantes se encuentran elevados en pacientes y ratas con cirrosis. Las CEH son las responsables principales de este incremento en la cirrosis experimental. Sin embargo se desconoce si la AP puede actuar sobre las CEH y mediar efectos profibrogénicos.

Objetivos: 1) Evaluar si la AP se encuentra sobreexpresada en CEH de pacientes cirróticos (CH). 2) Investigar los sistemas que regulan la inducción de AP y analizar si estimula genes fibrogénicos en una línea celular de CEH (LX2).

Métodos: La expresión y localización hepática de AP se evaluó en hígado CH y muestras control de origen humano por PCR a tiempo real (PCRtr) e inmunofluorescencia, respectivamente. Se cuantificó la expresión del mRNA de colágeno I (COLI) y del receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr β) en LX2 incubadas en hipoxia (5% O₂) o tratadas con AP (1 nM), lipopolisacárido

(LPS, 10 μ g/ml), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , 100 ng/ml), AII (80 pM) o ET-1 (2 nM). En aquellos casos en que se indujo la expresión de AP las células fueron pretratadas con un antagonista del receptor de la AP (F13A, 200 nM). Se cuantificó la expresión hepática de AP mediante PCRtr en ratas fibróticas tras bloquear con antagonistas específicos de aquellas vías que indujeron la síntesis de AP en CEH.

Resultados: Se observó sobreexpresión de AP en las CEH de los hígados CH humanos. La AP incrementó la expresión génica de COLI (1,6 \pm 0,2 vs 1,0 \pm 0,1 unidades arbitrarias (ua), p < 0,05) y PDGFr β (2,3 \pm 0,3 vs 1,0 \pm 0,1 ua, p < 0,02) en células LX2. De todos los factores utilizados, únicamente la AII (2,5 \pm 0,4 vs 1,0 \pm 0,1 ua, p < 0,01) y la ET-1 (2,1 \pm 0,3 vs 1,0 \pm 0,1 ua, p < 0,01) indujeron la expresión génica de AP en CEH. Por otra parte, la administración de antagonistas específicos de los receptores de AII o de ET-1 redujo la expresión hepática de AP en ratas CH (de 1,1 \pm 0,1 a 0,5 \pm 0,1 ua, p < 0,02 y de 1,3 \pm 1,2 a 0,7 \pm 0,1 ua, p < 0,02, respectivamente). Finalmente, el bloqueo del receptor de AP en LX2 disminuyó significativamente (p < 0,05) el efecto estimulador de AII y ET-1 sobre la expresión génica de COLI (de 2,0 \pm 0,2 y 2,1 \pm 0,1 a 1,3 \pm 0,1 y 1,3 \pm 0,1 ua, respectivamente) y PDGFr β (de 2,1 \pm 0,2 y 2,0 \pm 0,2 a 1,1 \pm 0,1 y 1,3 \pm 0,1 ua, respectivamente).

Conclusiones: Estos resultados indican que la AP media efectos profibrogénicos activados por AII y E1 en las CEH y sugieren que el sistema hepático de la AP podría ser una nueva diana terapéutica en la cirrosis humana.



COMUNICACIONES ORALES

XXXV Congreso Anual de la Fundación/Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 17-19 de febrero de 2010

Sesión general 3

Moderadores: Rubén Francés (Alicante)
y Raquel Muñoz (Madrid)

LA FIRMA GENÉTICA DE PROLIFERACIÓN-G3 IDENTIFICA LOS PACIENTES CON RECIDIVA TRAS RESECCIÓN DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR

A. Villanueva^a, Y. Hoshida^b, V. Tovar^a, D. Sia^a, H. Cornellá^a, C. Alsinet^a, J. Peix^a, S. Roayaie^c, S. Thung^c, J. Bruix^a, M. Schwartz^c, V. Mazzaferro^d y J.M. Llovet^{a,c}

^aLaboratori de Recerca Translacional d'Oncologia Hepàtica. BCLC-Group. IDIBAPS. CIBEREHD. Hospital Clínic. Barcelona. España.

^bBroad Institute. Boston, MA. EEUU.

^cLiver Cancer Program. Mount Sinai. New York, NY. EEUU.

^dIRCCS Istituto Nazionale Tumori. Milán. Italia.

Introducción: El 70% de los pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) inicial (BCLC0-A) sometidos a resección recidivan en los primeros 5 años. Se desconocen los factores genéticos que condicionan el riesgo de recurrencia en esta subpoblación.

Objetivos: Analizar la capacidad predictiva pronóstica de 20 perfiles de expresión genética en pacientes con CHC inicial tratado mediante resección quirúrgica.

Métodos: Se estudiaron 287 pacientes mediante análisis de expresión genética con plataformas whole-genome (~24.000 genes, Affymetrix U133 Plus 2.0 o DASL-Illumina) en tejido tumoral (n = 287) y cirrótico adyacente (n = 164). Evaluamos 20 firmas genéticas pronósticas (16 del tumor y 4 del tejido cirrótico) usando el método nearest-template. Para el análisis estadístico se construyeron curvas Kaplan-Meier (log-rank), incluyendo aquellas variables con p < 0,1 en un modelo multivariado de Cox con el fin de identificar factores predictores independientes de recurrencia tumoral.

Resultados: La mayoría de pacientes (varones: 72%, edad media 64 años) eran Child-Pugh A (96%, 258/287) en estadios tumorales iniciales (BCLC0-A: 92%, 260/287). El 32% (90/287) presentaban invasión vascular y el 30% tenían satelitosis en la pieza. Durante el seguimiento (mediana 45 meses) se produjeron 189 recurrencias (66%) y 96 fallecimientos (33%). De las 20 firmas genéticas evaluadas, sólo 15 asignaron pacientes en sus respectivos grupos de mal pronóstico (FDR < 0,05), existiendo solapamiento significativo en

las firmas relacionadas con ciclo celular: proliferación, ck19, cluster A, G3, Vi_sig, MET, TGFB; y en las de probable origen en células progenitoras: EpCAM y HB_S2. La firma genética G3 (Boyault-Hepatology 2007), presente en el 31% de los pacientes (64 recurrencias y 30 fallecidos), se asoció a recurrencia tumoral (HR: 1,59; IC95%: 1,17-2,15; p = 0,003) junto a variables clínicas (albúmina, invasión vascular, multinodularidad y BCLC). Tras análisis de Cox, la firma G3 (HR: 1,63; IC95%: 1,18-2,25; p = 0,002) fue identificada como variable con capacidad predictiva independiente para recurrencia junto al estadio tumoral BCLC (HR: 3,55; IC95%: 1,75-7,22; p < 0,001) y la albúmina (HR: 1,69; IC95%: 1,11-2,56; p = 0,01).

Conclusiones: La firma genética de proliferación-G3 predice recurrencia tumoral en pacientes con CHC inicial tratados con resección hepática. Los genes incluidos en esta firma deberán ser evaluados como potenciales dianas terapéuticas para tratamiento adyuvante.

ESTADO ACTUAL Y ABORDAJE TERAPÉUTICO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR EN ESPAÑA. ANÁLISIS DE 705 CASOS EN 62 CENTROS

M. Varela^a, M. Reig^b, M. de la Mata^c, A. Matilla^d, J. Bustamante^e, S. Pascual^f, J. Turnes^g, C. Aracil^h, A. del Valⁱ, J.M. Pascasio^j, M. Rodríguez^k y J. Bruix^l, del Grupo de Estudio de Cáncer Hepático (GECH)

^aSección de Hepatología. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Oviedo. España.

^bGrupo BCLC. Servicio de Hepatología. Hospital Clínic. IDIBAPS. Universitat de Barcelona. Ciberehd. Barcelona. España.

^cUnidad Clínica Aparato Digestivo. Hospital Universitario Reina Sofía. CIBEREhd. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Córdoba. España.

^dServicio de Digestivo. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

^eServicio de Digestivo. Hospital de Cruces. Bilbao. España.

^fUnidad Hepática. Hospital General Universitario de Alicante. CIBEREhd. Alicante. España.

^gServicio de Digestivo. Complejo Hospitalario de Pontevedra. Pontevedra. España.

^hServicio de Digestivo. Hospital Universitario Arnau de Vilanova. Lleida. Institut de Recerca Biomèdica. IRB. Lleida. España.

¹*Servicio de Medicina Digestiva. Hospital Universitario Dr. Peset. Universidad de Valencia. Valencia. España.*

²*Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Digestivas. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Universidad de Sevilla. Sevilla. España.*

Introducción: El carcinoma hepatocelular (CHC) es la principal causa de muerte en pacientes con cirrosis. La situación actual del CHC en España no es bien conocida y por ello, hemos desarrollado un registro nacional.

Objetivos: Conocer las características de los pacientes con CHC de novo diagnosticados en España.

Métodos: Sesenta y dos centros de referencia participaron en un registro común prospectivo con las características demográficas, clínicas y tumorales, así como la primera opción de tratamiento y la elegibilidad para el trasplante hepático (TOH) de los CHC diagnosticados entre el 1 de octubre de 2008 y el 31 de enero de 2009.

Resultados: Se registraron 705 casos en 4 meses: 78% hombres, edad media 65 años (22-93), 89% con cirrosis (58% Child-Pugh A, 32% Child-Pugh B), 42% secundarios a VHC y 30% secundarios a consumo de alcohol. Solamente 334 casos (47%) fueron diagnosticados por cribado. De ellos, el 76% presentaba CHC en fase inicial (18% < 2 cm, 45% 2- < 5 cm y 13% > 5 cm de diámetro). El tamaño del nódulo principal y el estadio BCLC fueron significativamente menores ($p < 0,001$) en el grupo diagnosticado por cribado que en el resto, y la aplicabilidad de las terapias radicales (resección y ablación percutánea) fue significativamente mayor: 47,5% vs 24,6% ($p < 0,001$), así como la evaluación para TOH 31% vs 12% ($p < 0,001$). La aplicación del programa de cribado no fue diferente en función del sexo ($p = 0,204$), edad ($p = 0,171$), infección por VIH ($p = 0,817$), diabetes ($p = 0,161$), obesidad ($p = 0,373$) o historia de cáncer ($p = 0,983$). Los pacientes con infección por VHC se diagnosticaron con mayor frecuencia en el seno de programas de cribado que los de otras etiologías (58,2% frente a 40,4%, $p < 0,001$). La quimioembolización es la terapia puente más común en espera de TOH (33%) y el tratamiento primario más indicado, en tumores dentro de criterios de Milán (46,4%), en tumores > 5 cm (15,7%) y en multifocales (37,9%).

Conclusiones: Estos datos demuestran que la mayoría de los CHC en España no se diagnostican dentro de los programas de detección precoz y esto limita la posibilidad de que el diagnóstico sea en estadio inicial y el tratamiento se aplique con intención curativa. La aplicación de las guías de práctica clínica debe aumentar la sensibilización ante este tipo de cáncer entre los médicos y mejorar su manejo desde el cribado hasta el tratamiento.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ENTRADA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO: RELACIÓN CON LA CINÉTICA VIRAL PRECOZ Y LA GRAVEDAD DE LA RECURRENCIA DE LA HEPATITIS C

G. Crespo, L. Mensa, M. Gastinger, R. Miquel, S. Pérez del Pulgar, S. Emerson, R.H. Purcell y X. Forns

Servicio de Hepatología. Hospital Clínic. IDIBAPS. Ciberehd. Barcelona. España.

Confocal Microscopy Unit and Laboratory of Infectious Diseases. National Institutes of Allergy and Infectious Diseases. National Institutes of Health. Bethesda, MD. EE.UU.

Introducción y objetivos: El trasplante hepático (TH) es un modelo único para la caracterización de los mecanismos de entrada del virus de la hepatitis C (VHC) en el hepatocito. El virus, tras contactar con scavenger receptor B1 (SRB1), se uniría a CD81 y, posteriormente, el complejo virus-receptor sería trasladado a las tight-junction celulares donde se internalizaría través de claudina-1 y ocludina. Los objetivos de este estudio fueron: a) caracterizar

el patrón de expresión de SRB1 y de las proteínas claudina-1 y ocludina en hígados de pacientes sometidos a TH, y b) analizar si los patrones de expresión se relacionan con la cinética precoz de infección del injerto y la severidad de la recidiva post-trasplante.

Pacientes y métodos: Se incluyeron 42 pacientes sometidos a TH por una cirrosis por VHC; en 23 se produjo una recidiva leve y en 19 una recidiva severa de la hepatitis C. Mediante técnicas de inmunohistoquímica, se identificaron SRB1, claudina-1 y ocludina en biopsias obtenidas durante la reperfusión, 3 y 12 meses post-TH. Las imágenes se adquirieron mediante un microscopio confocal Leica SP5; se procedió a la cuantificación y estudio de colocalización de los receptores mediante el software Imaris (Bitplane).

Resultados: SRB1 se expresó en toda la membrana hepatocitaria y especialmente en el polo sinusoidal; claudina-1 y ocludina únicamente se detectaron en el polo apical (canalículo biliar). Observamos una correlación significativa entre la cantidad de SRB1 (el primer receptor con el que contactaría el VHC) en la biopsia de reperfusión y la caída de RNA-VHC durante las primeras 24 horas del trasplante ($r = 0,6$, $p = 0,004$). La expresión de SRB1 se mantuvo estable tras el TH, mientras que la de claudina-1 aumentó significativamente entre 3 y 12 meses post-TH ($p < 0,01$), tanto en pacientes con recidiva leve ($p = 0,016$) como severa ($p = 0,031$). Este incremento en la expresión de claudina-1 no se asoció a la severidad de la colestasis bioquímica. La colocalización de claudina-1 y ocludina osciló entre un 50 y un 90%, sin que estas diferencias se asociaran a cambios morfológicos en su expresión en la membrana apical del hepatocito.

Conclusiones: Los niveles de expresión de SRB1 en injerto podrían condicionar la cinética de infección precoz por el VHC. Los cambios en los niveles de expresión de claudina-1 tras la infección del injerto por el VHC no se traducen en alteraciones en su patrón de expresión, que se limita a la membrana apical del hepatocito.

RESISTENCIA AL DESARROLLO DE ESTEATOSIS HEPÁTICA EN RATONES KNOCKOUT CONDICIONALES DE PPARGAMMA ESPECÍFICOS DE HEPATOCITO

E. Morán-Salvador, M. López-Parra, E. Titos, M. Martínez-Clemente, A. González-Pérez, R. Horrillo, C. López-Vicario, Y. Barak, V. Arroyo y J. Clària

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular y Unidad de Hígado. Hospital Clínic. IDIBAPS. CIBEK. CIBERhd. Universitat de Barcelona. Barcelona. España.

The Jackson Laboratory. Bar Harbor. Maine. EE.UU.

Introducción: PPARgamma es un receptor nuclear que juega un papel clave en la regulación del metabolismo lipídico y de carbohidratos. Aunque existen evidencias que demuestran que la expresión de PPARgamma en el hígado se encuentra aumentada en modelos experimentales de esteatohepatitis, su papel fisiopatológico es aún controvertido. En este sentido, mientras que algunos estudios demuestran que PPARgamma es capaz de inducir la lipogénesis y la acumulación de lípidos en hepatocitos, otros demuestran que la administración de tiazolidinedionas, agonistas del PPARgamma, produce efectos antiesteatóticos, probablemente mediante un aumento de la sensibilidad a la insulina.

Objetivos: Investigar la contribución de PPARgamma al desarrollo de esteatosis hepática en modelos de ratón a los que se han inactivado selectivamente mediante el sistema Cre-Lox P el gen para PPARgamma en hepatocito o en célula de Kupffer.

Métodos: Ratones con el gen PPARgamma "floxeado" (Control/F) fueron cruzados con ratones knockout condicionales específicos para hepatocito (PPARgammaF/F Alb-Cre, HepKO) o con ratones knockout condicionales específicos para célula de Kupffer (PPARgammaF/F LysM-Cre, KupfKO). Se establecieron grupos de 5-8 ratones

por colonia, a los que se les administró una dieta rica en grasa (60% Kcal) durante 12 semanas.

Resultados: En comparación con los ratones ControlF/F, los ratones HepKO presentaron un menor contenido hepático de lípidos cuantificados mediante tinción con Oil Red-O y una mayor tolerancia a la glucosa, efectos que se asociaron a una disminución en la expresión de genes, la mayoría de ellos regulados directamente por PPARgamma, implicados en la lipogénesis (SCD1, SREBP-1c y ACC), en el transporte de lípidos (CD36/FAT, LFABP y MTP), en la beta-oxidación (PPARalfa y ACO) y en el metabolismo de carbohidratos (PEPCK y Glut-2). Los ratones KupfKO también estuvieron parcialmente protegidos ante los efectos esteatóticos de la dieta rica en grasa, aunque los principales cambios en la expresión de genes lipogénicos, de transporte y de beta-oxidación se observaron en condiciones basales.

Conclusiones: Estos resultados indican que la expresión del receptor nuclear PPARgamma en el hepatocito constituye un factor proesteatótico en la enfermedad hepática de origen no alcohólica. Además estos resultados sugieren que la expresión de PPARgamma en la célula de Kupffer contribuye a la homeostasis basal del metabolismo lipídico y de la sensibilidad a la insulina.

LA INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL CON MUESTRAS HUMANAS IDENTIFICA LA OSTEOPONTINA COMO UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA EN PACIENTES CON HEPATITIS ALCOHÓLICA

O. Morales^a, M. Domínguez^a, E. Juez^a, M. Moreno^a, R. Miquel^b, J.J. Lozano^a, J. Colmenero^a, J.C. García-Pagán^a, V. Arroyo^a, P. Ginès^a, J. Caballería^a y R. Bataller^a

^aUnidad de Hepatología.

^bUnidad de Patología.

Hospital Clínic. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Barcelona. España.

Introducción: La hepatitis alcohólica (HA) es una enfermedad severa que se asocia a una alta mortalidad a corto plazo. El desarrollo de nuevas terapias requiere estudios traslacionales con muestras humanas que identifique nuevas dianas. El presente estudio investiga el posible papel de la osteopontina (OPN), una proteína que pertenece a la matriz extracelular y que también actúa como una quimiocina opsonizante de neutrófilos, en pacientes con HA.

Métodos: Se incluyó 44 pacientes con HA diagnosticada histológicamente en el Hospital Clínic. Se analizó el perfil de expresión génica en 20 pacientes con HA y 7 hígados normales mediante microarrays. La expresión génica hepática de OPN fue cuantificada en pacientes con HA (n = 44), hepatitis C (n = 23) y NASH (n = 17) y en hígados sanos (n = 7). La expresión proteica fue estudiada por inmunohistoquímica. Los niveles séricos de OPN fueron determinados mediante ELISA en todos los pacientes y en controles sanos (n = 15). La expresión de OPN se analizó en modelos celulares y en cortes de alta precisión de hígado de ratón mantenidos durante 24 h en cultivo. Se analizó los efectos de la OPN en HSC humanas primarias y en líneas celulares de hepatocitos.

Resultados: El 78% de los pacientes tenían una HA grave (índice ABIC = 6,71). El estudio de microarray identificó la OPN como uno de los genes más sobreexpresados (> 50 veces respecto al hígado normal). La expresión génica de OPN fue muy superior en pacientes con HA comparado con hepatitis C y NASH (p < 0,001). La expresión de OPN fue también superior en pacientes con HA severa comparado con los casos de HA leve (p = 0,03). Los estudios de inmunohistoquímica confirmaron estos resultados. Los niveles séricos de OPN también fueron superiores en pacientes con HA respecto a controles sanos y pacientes con hepatitis C (p < 0,001).

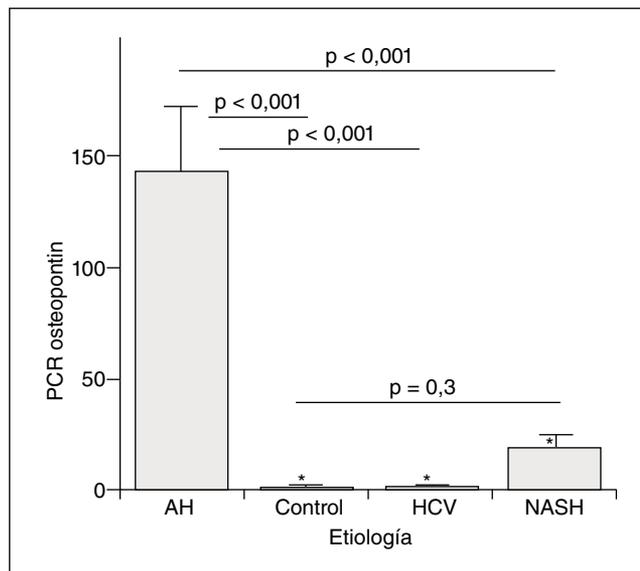


Figura 1

Los niveles séricos se correlacionaron con la expresión hepática (r = 0,8, p = 0,002) y con la severidad de la enfermedad. En cultivos tisulares, el LPS produjo un aumento de la expresión génica de OPN. Finalmente, el etanol indujo un aumento de la expresión de OPN en HSC, que a su vez estimuló la expresión de genes profibrogénicos.

Conclusiones: La expresión hepática y los niveles séricos de OPN están aumentados en la HA y se correlacionan con la severidad clínica. La OPN induce acciones pro-fibrogénicas en las HSC. Estos resultados sugieren que la OPN es un nuevo candidato para desarrollar nuevas terapias en estos enfermos.

RIESGO DE MORTALIDAD EN ESPERA DE TRASPLANTE HEPÁTICO E IMPACTO DE LA CONDICIÓN PRETRASPLANTE EN EL PRONÓSTICO FINAL

L. Hierro, M.C. Díaz, G. Muñoz Bartolo, C. Camarena, A. de la Vega, E. Frauca, M.D. Lledin, M.C. Díaz, N. Leal, J.L. Encinas, F. Hernández, J. Murcia, M. Gámez, M. López Santamaría y P. Jara

Servicio de Hepatología y Trasplante. Hospital Infantil Universitario La Paz. Madrid. España.

Objetivos: Evaluar el sistema de gradación de riesgo de fallecimiento por hepatopatía crónica "PELD" (fórmula basada en edad, score z de peso/talla, bilirrubina, INR y albúmina) en su relación con el riesgo de mortalidad en espera de trasplante hepático (TH) y los resultados del TH en nuestra serie.

Pacientes y métodos: Estudio retrospectivo en 71 niños consecutivos incluidos en lista de espera de primer TH desde 1/2007 a 2/2009. En esta serie el TH fue realizado priorizando los niños más graves según el conjunto de datos clínicos-analíticos. El diagnóstico era atresia biliar (43,6%), otra hepatopatía crónica (39,4%), metabolopatía sin cirrosis o tumor (11,2%) y fallo agudo (5,6%). La edad mediana fue 1,7 años. La enfermedad causó ascitis en 48,5% y hemorragia en 33,8%. Fueron calculados: PELD al final del seguimiento o pre-TH (PELD-fin), y 2-3 meses antes (media = 2,4) (PELD-0).

Resultados: 1) Al final del seguimiento: n = 6 (8,4%) fallecieron en espera, n = 14 (19,7%) siguen en espera, y n = 51 (71,8%) habían recibido TH. El tiempo de espera fue (mediana) 75 días, más corto

en TH de donante vivo (n = 27) comparado con TH de cadáver (n = 24, media de espera: 208 días). 2) La probabilidad de supervivencia en espera fue 92,3% a 3 meses desde la inclusión. Post-TH la probabilidad de supervivencia del injerto fue 80,2% a 6 meses y la del paciente de 94% a 12 meses; sobreviven 47 de 51 trasplantados. 3) La distribución de puntuación PELD-0 fue: < 3,6 (24%), 3,6-12 (29,5%), 13-22 (25%), 23-31 (11%) y > 31 (10%). La distribución de PELD-fin fue: < 3,6 (24%), 3,6-12 (31%), 13-22 (20%), 23-31 (10%) y > 31 (15%). Entre PELD-0 y PELD-fin hubo un empeoramiento franco (cambio de categoría) en 9 niños, mejoría en 5 y mantenimiento de igual categoría en 57 (80% de niños). 4) En los 6 niños fallecidos en espera el PELD-0 era ≥ 23 en 5/6 y el PELD-fin fue ≥ 23 en todos. 5) En niños con PELD-fin > 31 hubo significativamente menor supervivencia de injerto (40%) y del paciente (60%) mientras que el resto de categorías de PELD-fin no mostraron diferencias entre sí en pronóstico de injerto ni del paciente.

Conclusiones: Los niños con PELD-0 ≥ 23 tuvieron alto riesgo de mortalidad en espera (5/15 = 33,3%). Los resultados de supervivencia, tanto del injerto como de los pacientes, son influidos desfavorablemente por PELD > 31. Un sistema nacional de priorización en niños con PELD ≥ 23 podría evitar la progresión a categoría PELD > 31 y mejorar la supervivencia en lista y post-TH.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LXRALPHA Y DE LOS PRINCIPALES GENES LIPOGÉNICOS RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE ESTEATOSIS EN MODELOS IN VITRO DE HEPATITIS C

M.V. García-Mediavilla^{a,b}, E. Lima^a, S. Pisonero Vaquero^a, B. Merino Antolín^a, P.L. Majano^{c,b}, I. Benedicto^{c,b}, J. González-Gallego^{a,b} y S. Sánchez-Campos^{a,b}

^aInstituto de Biomedicina (IBIOMED). Universidad de León. León. España.

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

^cUnidad de Biología Molecular. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid. España.

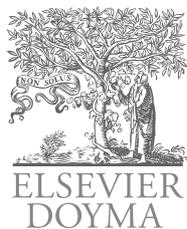
Introducción: Los mecanismos moleculares implicados en la aparición de esteatosis asociada al VHC no están bien establecidos, pudiendo desempeñar un papel fundamental la expresión de proteínas del VHC alterando el metabolismo lipídico. Los receptores X del hígado (LXR) actúan como señalizadores celulares de genes reguladores del metabolismo lipídico. Sin embargo, se desconoce la posible contribución de LXR en el desarrollo de esteatosis asociada a VHC.

Objetivos: Evaluar, en un modelo in vitro de hepatitis C, el efecto de las proteínas NS5A y core y de la replicación del VHC sobre el acúmulo intracelular de lípidos y la expresión génica de LXRalpha y de los principales genes lipogénicos regulados por él.

Métodos: Para la realización del estudio se utilizaron células de origen hepático (Chang liver, CHL) transfectadas establemente con la proteína estructural core (CHL-core) y no estructural NS5A (CHL-NS5A) del VHC, así como células derivadas de hepatoma humano (Huh7) que contienen el replicón vírico completo del VHC (genotipo 1b) (G1). Se determinó la presencia de lípidos citoplasmáticos mediante citometría de flujo, utilizando como fluoróforo Rojo Nilo. El estudio de la expresión génica de LXRalpha, SREBP-1c, SREBP-2, PPAR-gamma y FAS se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Resultados: Las células CHL-NS5A y CHL-core presentaron una mayor concentración citoplasmática de lípidos que las células CHL (+245% y +107%, respectivamente). Además, tanto la expresión de la proteína NS5A como de la proteína core indujo un incremento de la concentración de ARNm de LXRalpha, SREBP-1c, SREBP-2, PPAR-gamma y FAS (CHL-NS5A: +356%, +232%, +196%, +7800% y +101%, respectivamente; CHL-core: +33%, +28%, +22%, +817% y +53%, respectivamente), respecto a CHL. En las células G1, la replicación del VHC se acompañó de un mayor depósito intracelular de lípidos (+190%) que se correspondió con un incremento significativo de la concentración de ARNm de LXRalpha (+14%), SREBP-1c (+65%), SREBP-2 (+44%) y PPAR-gamma (+131%) respecto a las células Huh7 que no incluían el replicón del VHC.

Conclusiones: En nuestro modelo experimental in vitro, la replicación del VHC cursa con una sobreexpresión de los principales genes lipogénicos y el incremento del acúmulo lipídico intracelular, efecto mediado, al menos en parte, por la expresión de las proteínas NS5A y core del VHC. LXRalpha podría desempeñar un papel central en la alteración del metabolismo lipídico asociada a VHC.



COMUNICACIONES ORALES

XXXV Congreso Anual de la Fundación/Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 17-19 de febrero de 2010

Sesión general 4

Moderadores: Victoria Aguilera (Valencia) y Montserrat García-Retortillo (Barcelona)

FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON HEPATOCARCINOMA (HCC) TRATADOS MEDIANTE RADIOEMBOLIZACIÓN CON MICROESFERAS DE RESINA MARCADAS CON YTRIO 90 (Y90-RE)

B. Sangro, R. Cianni, S. Ezzidin, D. Gasparini, R. Golfieri, F. Kolligs, L. Carpanese y F. Fiore, en nombre de la European Network on Radioembolization with Y90 Microspheres (ENRY)

Unidad de Hepatología. Clínica Universitaria de Navarra y CIBEREHD. Pamplona. España.

Introducción: El pronóstico de los pacientes con HCC que son tratados mediante Y90-RE no ha sido evaluado en grandes series de pacientes.

Métodos: 250 pacientes con HCC irresecable fueron reclutados consecutivamente en 8 hospitales europeos entre septiembre de 2003 y abril de 2009. Todos recibieron Y90-RE utilizando microesferas de resina (SIR-Spheres). El cálculo de la dosis se realizó mediante el método de la superficie corporal o el modelo de partición. Se realizó un análisis univariante de supervivencia con múltiples potenciales factores pronóstico y aquellos que demostraron significación estadística fueron combinados en modelos multivariantes para identificar los mejores predictores de supervivencia.

Resultados: Los 250 pacientes (edad media 65,2 ± 10,5 años) recibieron una mediana de actividad de 1,7 GBq (rango 0,3-4,0), habitualmente en forma de tratamiento único (92,1%). La mayoría de los pacientes eran Child-Pugh A (81,2%) y tenían enfermedad multinodular (73,9%). El 36,1% tenían > 5 nódulos (habitualmente incontables), el 53,4% tenía enfermedad bilobar y el 16,4% tenía oclusión de la vena porta o sus ramas. La mediana de supervivencia fue de 14,1 meses (m) (IC95% 11,7-17,9) y no difirió entre los distintos centros. La supervivencia varió significativamente en función del score CLIP: CLIP 0: 24,4 m (19,6-no alcanzada), CLIP 1: 19,4 m (12,8-23,2), CLIP 2: 10,9 m (8,7-15,3) y CLIP 3/4: 7,6 m (6,5-11,7) (p < 0,001); el estadio BCLC: BCLC A: 22,1 m (15,1-46,8), BCLC B: 19,4 m (13,6-23,7), BCLC C: 10,0 m (7,7-11,7) (p < 0,001); el estadio Child-Pugh: Child-Pugh A: 15,9 m (13,1-20,8), Child-Pugh B:

10,3 m (7,4-12,6) y Child-Pugh C: 2,4 m (0,4-4,4) (p < 0,001); la carga tumoral: 1 nódulo: 24,4 m (17,9-46,8), 2-5 nódulos: 14,9 m (12,4-20,1) y > 5 nódulos: 8,7 m (7,2-11,4) (p < 0,001); y la presencia o ausencia de enfermedad extrahepática: 14,9 (12,4-20,1) vs 7,5 (4,3-13,1) m, p = 0,005. En el análisis univariado, todos estos factores así como la elevación (por encima de la mediana) de la bilirrubina total, la GPT y la alfa-fetoproteína, y el performance status fueron predictores significativos de supervivencia. En el análisis multivariado, el score CLIP: HR 1,33 (1,08-1,62), p = 0,006; la enfermedad extrahepática: HR 3,80 (1,95-7,43), p < 0,001; la nodularidad: HR 1,48 (1,13-1,94), p = 0,004; y la elevación de la bilirrubina total: HR 1,54 (1,06-2,25), p = 0,046 demostraron ser los predictores de supervivencia más consistentes.

Conclusiones: Además del score CLIP, la bilirrubina total, la presencia de enfermedad extrahepática y la nodularidad son potentes indicadores de la respuesta clínica de los pacientes con HCC irresecable al tratamiento mediante Y90-RE.

UTILIZACIÓN DE TARJETAS MICROFLUÍDICAS PARA LA PREDICCIÓN RÁPIDA Y AUTOMATIZABLE DE LA FALTA DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO

P. Martínez-Becerra^a, M.A. Serrano^a, M.R. Romero^a, N. Grañeb^b, L. Trigueros-Motos^b, A. del Río^c, L. Muñoz-Bellvís^d, I. Monte^a, F.J. Casado^b, M. Molina-Arcas^b, M. Pastor-Anglada^b y J.J.G. Marín^a

^aLaboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos. CIBEREhd. Universidad de Salamanca. Salamanca. España.

^bDepartament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat de Barcelona. CIBEREhd. Barcelona. España.

^cSanatorio Sagrado Corazón de Jesús. Valladolid. España.

^dHospital Universitario de Salamanca. Salamanca. España.

Introducción: Un grave problema común a los distintos tipos de cáncer hepático es su escasa respuesta a la quimioterapia. Junto al desarrollo de nuevos fármacos sería muy útil poder predecir la falta de respuesta a cada fármaco para enfocar el tratamiento con mayores probabilidades de éxito en el menor tiempo posible.

Objetivos: Con este fin se ha propuesto la obtención de la huella genética mediante microchips de RNA. Este es un método caro que aunque da una gran cantidad de información su interpretación es compleja. Por ello, en el marco de la "Acción Transversal

en Cáncer” del CIBERehd, nos propusimos desarrollar una herramienta más económica y automatizable, cuya información, aunque más limitada, fuese interpretable de forma rápida para su uso en clínica.

Métodos y resultados: Se eligieron 130 genes que se clasificaron según su implicación en los siguientes procesos de resistencia/sensibilidad a la quimioterapia (MOCs, mechanisms of chemoresistance): captación (MOC-Ia) y eflujo (MOC-Ib) de fármacos, metabolismo intracelular que determina la activación/inactivación de fármacos (MOC-II), cambio en la expresión o funcionalidad de dianas moleculares (MOC-III), procesos de reparación del ADN (MOC-IV) y balance supervivencia/apoptosis (MOC-V). Mediante RT-PCR, utilizando SYBR Green, se investigó la relevancia de la expresión de estos genes en tejido hepático sano y tumoral. Los resultados permitieron elegir 92 genes para el diseño de tarjetas microfluídicas para la determinación automatizable de los niveles de ARNm por RT-PCR utilizando sondas Taqman. Estas tarjetas se han validado en 6 muestras pareadas de tejido hepático sano y tumoral de carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma, así como de cultivos de líneas celulares derivadas de estos tumores sometidas o no a tratamiento con fármacos antitumorales a dosis IC50 calculadas en este estudio. Combinando los resultados de los niveles de expresión de los genes seleccionados con el valor del GRC (gene resistance coefficient), que describe la importancia de cada gen en su MOC para cada familia de fármacos, se calculó el TRI (tumor resistance index), que asigna un valor de predicción de refractariedad relativa de un tumor concreto a cada familia de fármacos antitumorales.

Conclusiones: Se ha puesto a punto y validado una herramienta fácil de utilizar y automatizable para la predicción de quimiorresistencia en tumores hepáticos, cuya utilidad deberá ser valorada en futuros estudios retrospectivos y prospectivos.

LOS MARCADORES SÉRICOS DE FIBROSIS PUEDEN DIFERENCIAR ENTRE PACIENTES CON RECURRENCIA DE LA HEPATITIS C LEVE O SEVERA DESPUÉS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

J.A. Carrión, G. Fernández-Varo, M. Bruguera, J.C. García-Pagán, J.C. García-Valdecasas, S. Pérez-del-Pulgar, X. Forns, W. Jiménez y M. Navasa

Unidad de Hepatología del Hospital Clínic. IDIBAPS. CIBERehd. Barcelona. España.

Introducción: La fibrosis significativa ($F \geq 2$) y la hipertensión portal (gradiente de presión venoso hepático [GPVH] ≥ 6 mmHg) al año del trasplante hepático (TH) indican una recurrencia progresiva de la hepatitis C que implica una rápida evolución a cirrosis y un peor pronóstico.

Objetivos: Evaluar la fiabilidad diagnóstica de los marcadores séricos de fibrosis para identificar $F \geq 2$ o GPVH ≥ 6 mmHg al año del TH en pacientes con recurrencia del VHC. **Métodos:** En 133 pacientes con recidiva C post-TH (2000-2006) se determinaron los niveles séricos de ácido hialurónico (AH), propéptido amino-terminal del procolágeno-III (PIIINP) y del inhibidor tisular de matriz de la metaloproteínasa-1 (TIMP-1) como marcadores directos de fibrosis a los 3, 6 y 12 meses tras el TH. Dieciséis pacientes sin infección por el VHC constituyeron el grupo control. A los 12 meses del TH se realizó una biopsia hepática en todos los enfermos ($n = 133$) y se determinó el GPVH en 94 pacientes. Se analizó la fiabilidad diagnóstica (curvas ROC) para identificar $F \geq 2$ o GPVH ≥ 6 mmHg al año del TH de 4 índices diferentes: el 3-M-ALG (combinación de los 3 marcadores directos de fibrosis), el ratio aspartato aminotransferasa/alanina aminotransferasa, el APRI y el índice de Benlloch.

Resultados: Al año del TH, 50 pacientes (38%) tenían $F \geq 2$ y 31 (32%) GPVH ≥ 6 mmHg. La fiabilidad diagnóstica (ROC) del 3-M-ALG a los 3, 6 y 12 meses del TH para identificar $F \geq 2$ (0,67, 0,77 y

0,78) o GPVH ≥ 6 mmHg (0,75, 0,87 y 0,90) al año del TH fue superior que la del resto de índices. Además, un valor del 3-M-ALG ≥ 2 a los 12 meses del TH identificó la mayoría de los pacientes con riesgo de descompensación y/ o muerte durante el seguimiento.

Conclusiones: Los marcadores séricos de fibrosis pueden diferenciar con precisión los pacientes con recurrencia C leve o progresiva después del TH.

PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN HÍGADO DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICA (EHGNA) EN LA OBESIDAD MÓRBIDA

A. Carazo^a, J. León^{a,b}, J. Casado^a, A. Gila^b, A. Martín^a, L. Sanjuán^a, S. Delgado^c, T. Caballero^{b,d}, J.L. Mundi^e y J. Salmerón^{b,e}

^aUnidad de Apoyo a la Investigación. Hospital Universitario San Cecilio. Granada. España.

^bCIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). España.

^cUnidad de Cirugía B. Hospital Universitario San Cecilio. Granada. España.

^dDepartamento de Anatomía Patológica. Universidad de Granada. Granada. España.

^eUnidad de Aparato Digestivo. Hospital Universitario San Cecilio. Granada. España.

Introducción: El objetivo de nuestro trabajo es relacionar la progresión de la EHGNA, durante la obesidad mórbida, con los niveles de expresión de genes asociados a la señalización de leptina, adiponectina e insulina, al estrés oxidativo y a la inflamación.

Métodos: Estudio prospectivo de 57 pacientes obesos mórbidos, biopsiados en el transcurso de la cirugía bariátrica. Las biopsias hepáticas se analizaron por el mismo anatomopatólogo según el score de Kleiner. De una fracción de la biopsia se extrajo RNA total y se cuantificó, mediante RT-PCR en tiempo real, la concentración de 15 ARNm: receptor activo de leptina (OBR-B), conjunto de los receptores de leptina (OBR-T), receptores de adiponectina 1 y 2 (ADIPO1, ADIPO2), receptor de insulina (INSR), sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1, IRS2), gen supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GRD), TNF α , IL6, y dos genes housekeeping (PPIA, RPS13). Definimos Resistencia Hepática a Leptina (RL) como el cociente OBR-T/OBR-B. En muestras de suero se realizó un perfil bioquímico completo y se midieron concentraciones de leptina, adiponectina, TNF- α e IL6. En eritrocitos se midieron actividades enzimáticas de glutatión peroxidasa y reductasa y concentraciones de glutatión oxidado y reducido.

Resultados: El 35% ($n = 20$) de los pacientes presentó esteatosis simple, el 47% ($n = 26$) probable esteatohepatitis y el 19% ($n = 11$) esteatohepatitis. El IMC fue 52 ± 8 . La progresión del EHGNA se asoció con incrementos en la expresión de: OBR-T ($p = 0,050$), RL ($p = 0,001$), ADIPOR1 ($p = 0,041$), ADIPOR2 ($p < 0,000$), GPX ($p < 0,000$) e iNOS ($p < 0,000$) y con descensos en la expresión de: SOCS3 ($p = 0,032$), IRS1 ($p = 0,019$) y TNF α ($p = 0,009$). En eritrocitos, la progresión del EHGNA se asoció con descensos de la actividad enzimática de GPX ($P = 0,047$) y del glutatión reducido ($p = 0,049$). Según el análisis multivariante, los factores independientes de no esteatohepatitis frente a esteatohepatitis fueron un descenso de RL (OR: 0,935, IC95% = 0,878-0,995) y un descenso de expresión de GPX (OR: 0,864, IC95% = 0,786-0,950).

Conclusiones: En hígado, el perfil de expresión de genes asociados a la señalización de leptina, adiponectina e insulina y al estrés oxidativo e inflamación, cambia con la progresión de la EHGNA. La resistencia hepática a leptina y los niveles de expresión de GPX, fueron factores independientes asociados a la progresión de la enfermedad.

OBTENCIÓN DE HEPATOCITOS FUNCIONALES A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES MEDIANTE LA RECREACIÓN IN VITRO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

P. Sancho-Bru^{a,b}, P. Roelandt^a, K. Pauwelyn^a, L. Ordovas^a, B. Bose^a y C. Verfaillie^a

^a*Stem Cell Institute Leuven. Leuven. Bélgica.*

^b*Unidad de Hepatología. Hospital Clínic. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Barcelona. España.*

Introducción: El cultivo de hepatocitos es fundamental para la investigación farmacéutica, el desarrollo de dispositivos hepáticos artificiales y nuevas estrategias terapéuticas. La escasez de hepatocitos humanos constituye el problema principal para el desarrollo de estas tecnologías. Una de las alternativas que se ha sugerido para obtener hepatocitos es el uso de células madre. En este trabajo describimos la obtención de hepatocitos funcionales a partir de células madre embrionarias (ES) o células madre inducidas pluripotentes (iPS) mediante un protocolo secuencial basado en la aplicación de factores de crecimiento activos en el desarrollo embrionario.

Métodos: Células ES e iPS de ratón y humanas se estimularon con factores de crecimiento según el siguiente patrón: Paso 1: estimulación con Activin A y Wnt3a para inducir la creación de la línea primitiva y endodermo; Paso 2: estimulación con FGF2 y BMP4 para inducir la especificación hepática del endodermo; Paso 3, estimulación con FGF1, FGF4 y FGF8 para inducir la formación y proliferación de hepatoblastos; Paso 4: estimulación con HGF y folistatina para inducir su maduración. La diferenciación fue monitorizada mediante RT-PCR cuantitativa, inmunocitoquímica y microscopía electrónica. Al final de la diferenciación se realizaron diferentes ensayos funcionales.

Resultados: Durante el primer paso, genes expresados típicamente en la línea primitiva y endodermo definitivo como *gooseoid*, *eomes*, *cxcr4*, y *sox17* fueron inducidos transitoriamente. Genes característicos de hepatoblasto y hepatocitos inmaduros como *foxa2*, *hnf4*, alfa-fetoproteína o *keratina19* se encontraron expresados durante los pasos 2 y 3 de la diferenciación. La expresión de genes típicos de hepatocitos maduros como la albúmina, alfa-1 antitripsina, tirosina amino-transferasa, factores de coagulación o diferentes citocromos fueron inducidos sólo durante el paso 4, la etapa de maduración. Mediante inmunocitoquímica se comprobó la expresión de los genes detectados por PCR. La población mayoritaria obtenida expresaba simultáneamente albúmina y alfa-fetoproteína indicando un fenotipo inmaduro. El análisis por microscopía electrónica mostró células diferenciadas con morfología de hepatocitos inmaduros, polarizadas, con numerosas mitocondrias y conectadas por uniones estrechas. Las células obtenidas al final de la diferenciación presentaban características funcionales típicas de hepatocitos como son la producción de albúmina, el almacenamiento de glicógeno, ciclo de la urea, y actividad inducible del citocromo por fenobarbital.

Conclusiones: Estos resultados demuestran que un único protocolo basado en el desarrollo embrionario del hígado permite la diferenciación de células pluripotentes de diferentes especies y orígenes, generando células con características fenotípicas y funcionales de hepatocitos.

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÓMICA (GWAS) CONFIRMAN UN LOCUS DE SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR VHC EN6P22.1-P21.31 Y PROPORCIONAN NUEVOS LOCOS CANDIDATOS PARA EXPLICAR EL RIESGO A LA INFECCIÓN, LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

M. Maraver^a, B. Pardo^a, J.A. del Campo^a, L. Grande^a, M. Diago^b, I. Carmona^c, R. Andrade^d, M.C. Rivero^e, J. Velasco^e, M.E. Sáez^e, J.J. Galán^e, R. Ramírez-Lorca^e, F.J. Morón^e, J.M. Carrasco^e, A. Salinas^e, E. Molero^e, J.L. Royo^e, C. Moreno^e, A. González Pérez^e, J. Gayán^e, L.M. Real^e, A. Ruiz^e y M. Romero-Gómez^a

^a*Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Digestivas y Ciberehd. Hospital Universitario de Valme. Sevilla. España.*

^b*Sección de Hepatología. Hospital General de Valencia. Valencia. España.*

^c*Servicio de Gastroenterología y Hepatología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. España.*

^d*Unidad de Hepatología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Málaga. España.*

^e*Departamento de Genómica Estructural. Neocodex SL. Parque Científico y Tecnológico Isla de la Cartuja. Sevilla. España.*

Objetivos: Identificar factores genéticos específicos implicados en la susceptibilidad a la infección por virus C, la progresión de la enfermedad o el resultado del tratamiento antiviral, estamos llevando a cabo un estudio multi-etapa de asociación genómica (Genome Wide Association Study -GWAS-) en España.

Métodos: La recogida de sangre se realizó de forma anónima en 148 casos confirmados de hepatitis C y en 801 controles independientes y no infectados de cuatro hospitales de referencia de nuestro país. Se extrajo DNA de los leucocitos mediante un protocolo automatizado (sistema Magnapure, Roche) y se genotiparon 262.264 marcadores SNP de cada persona utilizando la tecnología de chip de DNA 250K array Nsp I (Genechip System, Affymetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante. El control de calidad del proceso, el análisis de BRLLM y las matrices de datos se analizaron con el software Genotyping Console (Affymetrix). La estratificación de la población, delimitación de genotipos válidos, GWAS y el análisis de la imputación se realizó con el software Structure, Eigensoft, Plink y Haploview. Se obtuvo el consentimiento informado de cada individuo. Además, un comité externo de ética autorizó esta investigación.

Resultados: La tasa de genotipos válidos (call rate) medio obtenido fue del 98,98% y la heterocigosidad media observada en nuestra población para la matriz 250 K Nsp I fue del 27,18% en los controles y 27,19% en los casos con hepatitis C. Después de un extenso control de calidad y delimitación de SNPs, se obtuvieron 196.254 marcadores SNP y > 187 millones de genotipos útiles para GWAS y estudios de la imputación. Los análisis de Structure y Eigensoft no aportaron pruebas de la estratificación de la población en nuestras series. Se detectaron 3 SNP situados en los cromosomas 5, 6 y 13 que alcanzaron la significación estadística de amplitud del genoma ($p < 2,5 \cdot 10^{-7}$) y varios otros SNP mostraron pruebas sugerentes (pero no significativas GWAS) de la asociación al riesgo de infección por el VHC ($n = 325$ señales). Es importante destacar que muchos de estos SNP candidatos también mostraron la asociación a los resultados del tratamiento durante el post-hoc del análisis. Para validar nuestros resultados, se analizaron varios SNPs situados en 6p22.1-p21.31 dentro de la región genómica del HLA. Esta región genética ha sido previamente asociada a la susceptibilidad frente al virus C y a los resultados del tratamiento por otros grupos de investigación. Hemos observado que los marcadores dentro de la región HLA mostraron de moderada a alta la asociación con el fenotipo ($10^{-3} > p > 10^{-5}$). El análisis de la imputación de la región HLA nos permitió el análisis de 4.549 SNP adicionales de esta región, que confirmaron la asociación.

Conclusiones: El estudio GWAS y los análisis de la imputación confirmaron la asociación de HLA al riesgo de infección por VHC y nos ha proporcionado nuevas regiones genómicas candidatas que serán de utilidad para posterior investigación y validación.

EL BLOQUEO DE LA VÍA SENSITIVA AFERENTE PREVIENE LA ATROFIA SIMPÁTICA Y LAS ALTERACIONES HEMODINÁMICAS DE LA HIPERTENSIÓN PORTAL

N. Ezkurdia, M. Coll, I. Raurell, J. Genescà y M. Martell

Institut de Recerca. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

Introducción: La hipertensión portal provoca una intensa inhibición de RNAm y proteínas implicados en la transmisión adrenérgica con una marcada atrofia de la innervación simpática en arteria mesentérica superior (AMS) en ratas con ligadura de la vena porta (PVL) y con cirrosis experimental.

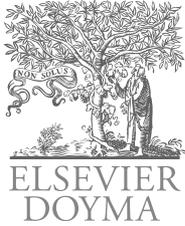
Objetivos: La señal que provoca esta atrofia simpática podría iniciarse en los nervios sensitivos aferentes que detectan los cambios de presión a nivel portal. Investigamos si bloqueando esta señal aferente, se evita la atrofia simpática y mejora el trastorno hemodinámico.

Métodos: Ratas PVL adultas tratadas previamente con capsaicina (neurotoxina que provoca una desfuncionalización selectiva de las neuronas aferentes sensitivas desmielinizadas) (n = 12) o con ve-

hículo (n = 5). Parámetros evaluados: hemodinámicos (presión arterial media, presión portal, flujo y resistencia AMS), inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa (Th) en muestras de AMS y Western Blot de proteína Th en arterias de resistencia mesentéricas.

Resultados: El 40% de los animales tratados con capsaicina respondieron al tratamiento (CR, n = 5), mostrando valores hemodinámicos similares a ratas sin hipertensión portal. Todos los parámetros hemodinámicos (excepto la presión portal) mostraron una diferencia significativa entre los animales CR y vehículo: presión arterial (127 ± 6 vs $108 \pm 0,6$ mmHg, $p = 0,03$), flujo AMS ($4,5 \pm 0,2$ vs $6,3 \pm 0,4$ mL/min.100 g, $p = 0,003$) y resistencia AMS ($25,4 \pm 1,9$ vs $15,7 \pm 1$ mmHg/mL.min.100 g, $p = 0,004$). La inmunohistoquímica de Th mostró un aumento significativo del número de los paquetes axonales que envuelven la AMS en CR con respecto a vehículo ($22,6 \pm 3,2$ vs $7,6 \pm 1,6$ nervios, $p = 0,003$), del área total de los paquetes nerviosos (209.829 ± 23.980 vs 90.176 ± 33.579 μ^2 , $p = 0,02$) y del área que expresa Th (58.405 ± 18.295 vs 19.014 ± 6.069 μ^2 , $p = 0,07$). La expresión de la proteína Th en arterias de resistencia experimentó un aumento significativo del 30% ($p = 0,03$) en los animales CR con respecto a los vehículos.

Conclusiones: La recuperación de las alteraciones hemodinámicas y la prevención de la atrofia simpática tras el bloqueo de la señal aferente sensitiva, refuerzan la contribución del sistema adrenérgico en la vasodilatación arterial esplácnica de la hipertensión portal y sugieren que la señal aferente puede ser un factor desencadenante del proceso.



COMUNICACIONES ORALES

XXXV Congreso Anual de la Fundación/Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 17-19 de febrero de 2010

Sesión general 5

Moderadores: Joaquín de la Peña (Santander) y Beatriz Mínguez (Barcelona)

EFECTO ANTITUMORAL DE LA EXPRESIÓN REGULADA DE MIL12 EN EL HÍGADO, MEDIADA POR EL VECTOR RAAV8-PTETBIDI-PALB-MIL12

L. Vanrell, I. Otano, P. Berraondo, L. Tenenbaum, J. Prieto y G. González-Aseguinolaza

Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Pamplona. España.

Introducción: La actividad antitumoral de la IL-12 ha sido demostrada en numerosos modelos de cáncer. Estos modelos también subrayaron su gran toxicidad, principalmente mediada IFN γ . La expresión local de la IL-12 puede alcanzarse utilizando vectores de terapia génica. Hasta la fecha se han realizado 25 ensayos clínicos para evaluar la transferencia génica de IL-12 para el tratamiento de varias transformaciones malignas. Si bien los niveles de IL-12 alcanzados fueron suficientes para evidenciar la estimulación del sistema inmune, los efectos sobre el crecimiento tumoral fueron discretos. Por ello, todavía queda una amplia ventana terapéutica por explorar, que puede aumentar los efectos tumorales obtenidos hasta el momento. Para llevar a cabo dicho objetivo, es necesario el desarrollo de vectores de nueva generación, que permitan la expresión de niveles de IL-12 más altos y regulados. En este trabajo nos propusimos emplear el vector adeno-asociado (AAV), con un sistema inducible hepato-específico desarrollado, como vehículo de la IL-12 para el tratamiento de metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal en un modelo de ratón. La implantación en el hígado de la línea MC38 en ratones C57, constituye un tipo de modelo de cáncer intrahepático muy utilizado en aproximaciones de inmunoterapia y otras terapias pre-clínicas.

Métodos: Ratones C57BL/6 fueron inyectados con cuatro dosis diferentes del AAV que transportaba el sistema inducible de expresión de IL-12 (5×10^{12} , $1,5 \times 10^{12}$, 5×10^{11} , $1,5 \times 10^{11}$ genomas virales/Kg). Tras 15 días se inyectaron células tumorales MC38 en el hígado de estos ratones tras laparotomía. Transcurridos 10 días cuando el tumor alcanza un diámetro de alrededor de 5 mm se inició la inducción de la expresión de IL-12 mediante administra-

ción de tetraciclina. Se midieron los niveles de IL-12 mediante e IFN γ mediante ELISA y se determinó la supervivencia de los animales así como el desarrollo de respuestas CD8 frente al tumor mediante utilización de tetrámeros específicos y análisis por FACS.

Resultados: Los ratones que recibieron la dosis más alta del vector fueron sacrificados o murieron debido a que los altos niveles de IL-12 resultaron tóxicos. Sin embargo, en los ratones tratados con las dosis intermedias no se observó toxicidad y todos ellos rechazaron el tumor. En los animales tratados con la dosis mas baja no se observó efecto terapéutico alguno. En aquellos ratones que rechazaron se observó la inducción de una potente respuesta CD8.

Discusión: Nuestros resultados muestran que vectores virales en AAV portadores de un sistema de expresión de IL-12 inducible y hepatoespecífico, rAAV8-pTetbidi-pAlb-mIL12, presentan un potente efecto antitumoral en el modelo singénico de metástasis hepáticas de adenocarcinoma colorrectal, y la inducción de una eficiente respuesta de memoria frente a las células tumorales. Además, no se observó toxicidad asociada a la inducción de mL-12.

PAPEL DE LA ESFINGOMIELINASA ÁCIDA EN LA ACTIVACIÓN DE LAS CEH Y LA FIBROSIS HEPÁTICA

A. Moles, N. Tarrats, A. Morales, M. Domínguez, R. Bataller, J. Caballería, C. García-Ruiz, M. Marí y J.C. Fernández-Checa

Unidad de Hepatología. Hospital Clínic i Provincial. CIBEREHD. CIBEK. IDIBAPS. IIBB-CSIC. Barcelona. España.

Introducción: La activación y la proliferación de las células estrelladas hepáticas (CEH) son procesos fundamentales para la fibrosis hepática, lo que reflejaría un claro signo de progresión de la enfermedad hepática. A pesar de que se ha descrito la participación de la esfingomielinasa ácida (ASMasa) en la muerte del hepatocito, su contribución a la activación de las CEH y a la fibrogénesis es todavía poco clara. Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue analizar la contribución de la ASMasa al proceso de transdiferenciación de las CEH y a la fibrosis hepática, y su expresión en pacientes con diferentes grados de esteatohepatitis no alcohólica.

Métodos: CEH primarias procedentes de ratones ASMasa+/+ y ASMasa+/- fueron aisladas y cultivadas en plástico en DMEM + 10% FBS, hasta el día 9. Las actividades de la ASMasa y la esfingomielinasas neutra (NSMasa) se determinaron mediante el uso de un análogo fluorescente de la esfingomielina. La proliferación celular se

analizó por la incorporación de 3H-timidina al ADN. El silenciamiento génico de ASMas se realizó mediante transfección de ARN de interferencia comercial. La fibrosis hepática se indujo por ligación del conducto biliar durante 4 días. El ARN procedente de biopsias humanas se extrajo con TRIzol bajo condiciones de esterilidad y se realizó PCR a tiempo real por cuadruplicado usando un ABI PRISM-7900 con sondas Taq-Man prediseñadas para los genes diana a estudio.

Resultados: Se observó una estimulación selectiva de la ASMas, pero no de la NSMas, paralela a la activación in vitro de las CEH, coincidiendo con un aumento de la expresión de la catepsina B (CtsB) y D (CtsD). La inhibición de la ASMas, farmacológica o mediante siRNA, resultó en una disminución de la expresión de CtsB/D. Además se observó una disminución de la activación de las CEH, así como de su capacidad proliferativa, probablemente a causa de la ausencia de fosforilación de AKT en respuesta al PDGF. La ligación del conducto biliar en ratones ASMas+/-, que presentan un 40% de actividad ASMas en hígado respecto a ratones salvajes, resultó en un menor daño hepático y una menor fibrosis. La inhibición de CtsB en las CEH de estos ratones, resultó también en una disminución del marcador α -SMA, así como de la capacidad proliferativa de estas células. Por último, biopsias de hígado procedentes de pacientes con esteatohepatitis no alcohólica mostraron un incremento de los niveles de ARN mensajero tanto de la CtsB como de la ASMas.

Conclusiones: Estos resultados muestran la participación de la ASMas en la biología y activación de las CEH a través de la regulación de las catepsinas B/D, revelándose como una posible diana terapéutica para la fibrosis hepática.

CAPACIDAD PREDICTIVA DEL GRADIENTE DE PRESIÓN VENOSA HEPÁTICA PARA LA DESCOMPENSACIÓN DE LA CIRROSIS POR VIRUS C: VALIDACIÓN EN UNA COHORTE EXTERNA DE UN ÍNDICE PRONÓSTICO

D. Rincón, A. Hernando, O. Lo Iacono, M. Tejedor, M. Salcedo, M.V. Catalina, C. Ripoll, M. Senosiain, A. Matilla, G. Clemente, A. Albillos y R. Bañares

Sección de Hepatología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Hospital Universitario Ramón y Cajal. CIBERhd. Madrid. España.

Introducción: El gradiente de presión venosa hepática (GPVH) tiene un marcado valor pronóstico para la descompensación de la cirrosis en pacientes sin varices esofágicas. Se desconoce si dicha capacidad es similar en pacientes cirróticos por virus C, que presentan una posibilidad de tratamiento etiológico limitada.

Objetivos: Analizar en una cohorte exploratoria (n = 145) y una de validación independiente (n = 38) la capacidad predictiva del GPVH para la descompensación en pacientes con cirrosis por virus C, con o sin varices.

Pacientes y métodos: Criterios de inclusión: cirrosis por virus C sin descompensaciones previas con una medición basal del GPVH. Definición de descompensación: desarrollo de ascitis, hemorragia por varices, ictericia o encefalopatía. En la cohorte exploratoria se realizó un modelo de Cox uni- y multivariante en el que la variable dependiente fue el desarrollo de descompensación. Se realizó un análisis de remuestreo con reemplazamiento para observaciones censuradas ("bootstrapping") para analizar la validez interna del modelo. Para valorar la capacidad discriminativa se realizó un análisis de curvas ROC dependientes del tiempo. Se elaboró un índice de riesgo (IR) para analizar la capacidad predictiva (calibrativa) del modelo en la cohorte independiente.

Resultados: Durante un seguimiento mediano de 27 meses se descompensaron 42 pacientes de la cohorte exploratoria (29%). La causa más frecuente fue la ascitis (62%). En el análisis univariado,

MELD, albúmina, plaquetas, existencia de varices y GPVH se asociaron al riesgo de descompensación. En el análisis multivariado, únicamente albúmina [HR: 0,42 (0,22-0,82)] y GPVH [HR: 1,11 (1,05-1,17)] alcanzaron significación pronóstica. El análisis "bootstrapping" confirmó la validez interna de los resultados (HR albúmina: IC95% 0,12-0,74; HR GPVH: IC95% 1,05-1,18). El modelo obtenido se asoció a un área bajo la curva ROC dependiente del tiempo de 0,73. El IR (0,11 \times GPVH - 0,8 \times albúmina), con un punto de corte de -0,95 obtenido del análisis de la curva ROC dependiente del tiempo, separa dos poblaciones con riesgo claramente diferente de descompensación en la cohorte de validación (0%-0%-6% frente a 11%-52%-75% a 1-2-5 años respectivamente; p = 0,027).

Conclusiones: El GPVH es una variable pronóstica robusta para la predicción de descompensación en pacientes con cirrosis por virus C. La aplicación de un índice pronóstico con la albúmina y el GPVH permite discriminar pacientes con diferente riesgo de descompensación.

PERFILES METABÓLICOS COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO NO INVASIVO DE LA ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA

J. Caballería^a, J. Barr^b, A. Domínguez-Díez^c, A. Martín-Duce^d, O. Lo Iacono^e, Y. Le Marchand-Brustel^f, S.C. Lu^g y J.M. Mato^h

^aHospital Clinic, Ciberehd. Barcelona. España.

^bOWL Genomics. Derio. España.

^cHospital Marqués de Valdecilla. Santander. España.

^dHospital de Alcalá de Henares. Madrid. España.

^eHospital del Tajo. Aranjuez. Madrid. España.

^fINSERM. Niza. Francia.

^gUSC. Los Angeles. EE.UU.

^hCIC bioGUNE. Ciberehd. Derio. España.

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una de las enfermedades hepáticas más prevalentes. Mientras que la esteatosis simple tiene un buen pronóstico, la esteatohepatitis (EHNA) puede progresar hasta la cirrosis. La biopsia es el método utilizado para el diagnóstico del HGNA, pero es una técnica invasiva, cara, no exenta de riesgo y sujeta a error de muestra. Por ello es necesario disponer de métodos alternativos que permitan el diagnóstico de la EHNA. El objetivo del estudio ha sido investigar si, mediante la aplicación de técnicas de metabolómica es posible identificar biomarcadores séricos capaces de diferenciar la EHNA de la esteatosis simple. Para ello se han estudiado 216 pacientes con obesidad mórbida e HGNA, diagnosticados por biopsia. De acuerdo con el análisis histológico 189 pacientes tenían esteatosis de diversa intensidad (grado 1, 76, grado 2, 63 y grado 3, 50 pacientes, respectivamente) y 27 pacientes EHNA. Asimismo, se han estudiado 28 controles con hígado normal. Todos los grupos de pacientes fueron similares en cuanto a edad, sexo e índice de masa corporal. El análisis de las muestras se efectuó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectrometría de masas. Se realizó el procesamiento estadístico de los datos mediante análisis multivariante, obteniéndose la clasificación de las muestras en los diferentes grupos. Los resultados han mostrado una clara correlación entre los diferentes grados de HGNA y el perfil metabólico de los pacientes estudiados, identificándose 11 biomarcadores capaces de distinguir los pacientes con EHNA de aquellos con esteatosis simple. Para efectuar una primera validación de los resultados se procesaron a ciegas las muestras de 10 pacientes, 6 con esteatosis y 4 con EHNA, consiguiendo diagnosticar correctamente a 9 de los 10 pacientes. Los resultados del estudio indican que los pacientes con HGNA tienen un comportamiento metabólico diferente según estén afectados de una esteatosis simple o una EHNA, por lo que pueden ser diferenciados empleando un conjunto de marcadores seleccionados. El análisis metabólico podría ser un método no invasivo, alternativo a la biopsia, para el diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica.

LA ACTIVACIÓN DE PPARALFA REDUCE LA PRESIÓN PORTAL Y MEJORA LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA CIRROSIS

A. Rodríguez-Vilarrupla, B. Laviña, H. García-Calderó, L. Russo, M. Fernández, J. Bosch y J.C. García-Pagán

Laboratorio de Hemodinámica Hepática. Hospital Clinic. IDIBAPS. Ciberehd. Barcelona. España.

Introducción: PPARalfa es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la familia de los receptores nucleares y que en su programa transcripcional tiene, entre otros, genes implicados en la regulación del tono vascular, el estrés oxidativo y la fibrosis, todos ellos implicados en el desarrollo de hipertensión portal en la cirrosis, lo que sugiere que su manipulación podría tener efectos beneficiosos en la hipertensión portal. **Objetivos:** Evaluar en ratas cirróticas por CCl4 (CH) los efectos de la activación de PPARalfa con fenofibrato sobre a) la hemodinámica hepática y sistémica, b) la disfunción endotelial intrahepática y c) la fibrosis hepática.

Métodos: Se trataron ratas CH con fenofibrato (FF); 25 mg/Kg/día; n = 9, o su vehículo (acetona; n = 10), por vía oral durante 7 días. Posteriormente se midió a) in vivo: presión arterial media (PAM), presión portal (PP), flujo portal (FP); b) en hígados aislados y perfundidos se evaluó la función endotelial mediante curvas de relajación a dosis crecientes de acetilcolina; y c) el grado de fibrosis (tinciones con Sirius Red y tricrómico de Masson) y el grado de activación de las células hepáticas estrelladas (expresión proteica de actina de músculo liso [alfaSMA] y de PDGFRbeta, expresión génica de TIMP-1, colágeno-1, colágeno-3, MMP9 y TGFbeta).

Resultados: La activación de PPARalfa con FF en ratas CH a) disminuyó de forma significativa la PP (26%) y el FP (46%) y aumentó significativamente la PAM (24%); b) mejoró la respuesta endotelio-dependiente a acetilcolina; y c) disminuyó la expresión proteica de alfaSMA y la fibrosis, tal y como evidenciaron las tinciones con Sirius Red y tricrómico de Masson. De los genes analizados sólo disminuyó el colágeno-1.

Conclusiones: La activación de PPARalfa con FF determina efectos beneficiosos en el síndrome de hipertensión portal y en la fibrosis, lo que sugiere que PPARalfa podría representar una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la hipertensión portal en la cirrosis.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN A LARGO PLAZO DEL ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES CB-1 SOBRE LA HEMODINÁMICA SISTÉMICA, TRANSLOCACIÓN BACTERIANA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA EN RATAS CIRRÓTICAS CON ASCITIS

G. Òdena^{a,d,e}, R. Bartolía^{a,d,e}, D. Galán^c, A. Serafín^b, L. Fluvià^{d,e}, M. Miquel^d, R. Morillas^{a,d,e}, M. Sala^{a,e} y R. Planas^{a,d,e}

^aServicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España.

^bMedicina Animal y Cirugía. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona. España.

^cServicio de Bioquímica. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España.

^dCIBEREHD. Barcelona. España.

^eFundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut. Badalona. Barcelona. España.

Introducción: Rimonabant, antagonista selectivo del receptor de endocannabinoides CB1, ha mostrado efectos beneficiosos en la progresión de la fibrosis, alteraciones hemodinámicas y formación de ascitis, sobretudo en administración aguda o en pretratamiento a largo plazo. El objetivo fue investigar el efecto del tratamiento a largo plazo con rimonabant sobre la incidencia de translocación

bacteriana (TB) hemodinámica sistémica y desarrollo de encefalopatía hepática (HE) en ratas cirróticas ascíticas.

Métodos: Rimonabant (3 mg/Kg/día) fue administrado durante 10 días a ratas cirróticas ascíticas (C+R; n = 10) y a ratas sanas (S+R; n = 10). Sus respectivos controles recibieron vehículo (C+V; n = 10, S+V; n = 10). Se tomó la presión arterial media y se evaluó el grado de derivación portosistémica mediante microesferas fluorescentes. Se realizaron estudios de TB (cultivo de ganglios mesentéricos), función hepática, evaluación del edema cerebral de bajo grado, amonío cerebral y histología hepática.

Resultados: Las ratas cirróticas tratadas con rimonabant mostraron una menor fibrosis hepática (C+R: 11,29 ± 4,63 vs C+V: 24,14 ± 9,23% área fibrosis; p < 0,01) y se restablecieron los niveles normales de presión arterial (C+V: 116,0 ± 2,08 vs C+R: 136,2 ± 5,36, S+R: 145,7 ± 2,68 y S+V: 137,5 ± 2,84 mmHg; p < 0,05). El grado de derivación portosistémica fue menor en las ratas cirróticas tratadas (C+R: 13,59 ± 4,25 vs C+V: 38,72 ± 10,1%; p = 0,044). Además, rimonabant mejoró significativamente parámetros de función hepática como bilirrubina (C+R: 2,39 ± 0,9 vs C+V: 7,12 ± 2,27 μmol/L) ALT (C+R: 89,27 ± 7,64 vs C+V: 284,0 ± 110,9 UI/L) y AST (C+R: 226,1 ± 33,32 vs C+V: 548 ± 142,5 UI/L) (p < 0,05). Esto se asoció a una disminución en la incidencia de TB (C+R: 2/10, C+V: 4/9, S+R: 0/10 y S+V: 0/10) y a la normalización del amonío cerebral (C+R: 4,44 ± 0,52, C+V: 4,86 ± 0,34, H+R: 3,75 ± 0,37 y H+V: 3,65 ± 0,34 mmol/Kg) y del edema cerebral de bajo grado (C+R: 78,98 ± 0,06, C+V: 79,25 ± 0,66, H+R: 78,67 ± 0,10 y H+V: 78,76 ± 0,09% H2O).

Conclusiones: El tratamiento a largo plazo con rimonabant disminuye la fibrosis hepática y mejora la hemodinámica esplácnica y sistémica así como algunos parámetros de función hepática. Esto se asocia con una reducción de la TB. Además, reduce el amonío cerebral y el edema cerebral de bajo grado. Rimonabant podría ser una terapia útil para algunas de las complicaciones asociadas a la cirrosis como las infecciones bacterianas y la EH.

LOS FENOTIPOS CD127 Y PD-1 DEFINEN LA REACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS T CITOTÓXICAS VHC ESPECÍFICAS DURANTE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR VIRUS DE LA HEPATITIS C

J.R. Larrubia^a, S. Benito^a, J. Miquel^a, M. Calvino^a, E. Sanz-de-Villalobos^a, A. González-Praetorius^a, S. Albertos^b y T. Parra-Cid^a

^aUnidad de Hepatología Traslacional. Hospital Universitario de Guadalajara. Universidad de Alcalá. Guadalajara. España.

^bServicio de Aparato Digestivo. Fundación Jiménez-Díaz. Universidad Autónoma. Madrid. España.

Introducción: La reactividad de los linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos contra el virus de la hepatitis C (VHC) se encuentra alterada en la infección persistente y se relaciona con la expresión de la molécula PD-1. Sin embargo, algunos sujetos con hepatitis crónica mantienen células con capacidad proliferativa. Esto podría relacionarse con el efecto anti-apoptótico de IL-7. Para obtener este beneficio es necesaria la expresión del receptor de IL-7 (CD127) en los LTC. En este trabajo se analizó la capacidad proliferativa de los LTC VHC-específicos y sus fenotipos PD-1/CD127 en relación con el control viral.

Material y métodos: Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica de pacientes HLA-A2+ VHC+ (Grupo-1 [Carga viral < 40 UI/ml]: 17 casos; Grupo-2 [Carga viral > 105 UI/ml]: 41 casos). Se visualizaron los LTC VHC-específicos mediante tinción con complejos pentaméricos HLA-A2/péptido-PE (Pentámero) y Ac anti-CD8-Cy. Los fenotipos PD-1/CD127/CD45RO/CD28/CCR7 se analizaron mediante tinción con Ac marcados con FITC. La capacidad proliferativa se evaluó mediante estimulación de las células T con péptidos específicos. Las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo.

Resultados: Las células CD8+/Pentámero+ ex-vivo mostraron un fenotipo PD1bajo/CD127alto en el grupo 1, mientras que éste fue opuesto en el grupo 2 ($p < 0,05$). Se observó proliferación in-vitro tras estimulación específica en el 77% de los casos en el grupo 1, pero solamente en el 20% de los sujetos del grupo 2. Curiosamente, los pacientes del grupo 2 con células con capacidad de expansión presentaban directamente ex-vivo mayor expresión de CD127 que los sujetos con células sin capacidad proliferativa ($p < 0,05$). Los LTC VHC-específicos tras expansión presentaban un fenotipo memoria-efector en ambos grupos: CD45RO alto/CCR7bajo/CD28intermedio

pero diferente fenotipo PD-1/CD127. Tras expansión in-vitro, las células CD8+/Pentámero+ adquirieron un fenotipo PD-1bajo/CD127bajo en los sujetos del grupo 1, mientras que las células T que proliferaron en el grupo 2 eran PD-1alto/CD127intermedio ($p < 0,01$).

Conclusiones: En la infección persistente por VHC, los LTC VHC-específicos PD-1alto que mantienen capacidad proliferativa, en el contexto de una elevada carga viral, están enriquecidos en células que expresan CD127. Estrategias encaminadas a incrementar la expresión de CD127 en los LTC VHC-específicos durante la infección persistente podría mejorar la reactividad de estas células.



COMUNICACIONES ORALES

XXXV Congreso Anual de la Fundación/Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 17-19 de febrero de 2010

Sesión general 6

Moderadores: Miguel Ángel Simón (Zaragoza) y Juan Arenas (San Sebastián)

¿DEBE PROLONGARSE EL TRATAMIENTO A 72 SEMANAS EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA C GENOTIPO 1 Y RESPUESTA VIROLÓGICA LENTA? RESULTADOS DE UN ESTUDIO MULTICÉNTRICO ALEATORIZADO

M. Buti, R. Bárcena, R. Moreno, J. Such, J.M. Viver, J.L. Calleja, A. López, J. Ortiz, R. Esteban y Grupo Español del Estudio Succes

Hospital General Universitario Vall d'Hebron. Barcelona. España.
Hospital de la Princesa. Madrid. España.
Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.
Hospital Universitario de Alicante. Alicante. España.
Hospital Mutua de Terrasa. Barcelona. España.
Hospital Puerta de Hierro. Madrid. España.
Hospital General Yagüe. Madrid. España.
Hospital de Terrasa. Barcelona. España.

Introducción: En pacientes infectados por genotipo 1, el beneficio de prolongar el tratamiento a 72 semanas se ha observado en estudios que utilizaban interferón pegilado y una dosis subóptima de 800 mg de ribavirina durante 48 o 72 semanas.

Objetivos: Estudiar la Respuesta Virológica Sostenida (RVS) en pacientes infectados por Genotipo 1, respondedores lentos tratados con interferón pegilado y una dosis ajustada a peso de ribavirina durante 48 o 72 semanas.

Pacientes y métodos: Estudio prospectivo aleatorizado que incluyó, 1428 pacientes naïve con hepatitis crónica C genotipo 1 que fueron tratados con PEG-IFN alfa-2b (1,5 µg/kg/semana) y ribavirina (800-1400 mg/día). Los pacientes con RNA-VHC detectable y una caída $\geq 2\log_{10}$ en sus niveles (respondedores lentos) a la semana 12 fueron aleatorizados 1:1 a recibir un total de 48 o 72 semanas de tratamiento.

Resultados: La tasa de RVS en intención de tratar fue del 43,0% en los pacientes tratados durante 48 semanas y del 47,9% en los tratados durante 72 semanas ($p = 0,6445$). Y por pacientes tratados del 46% y 57% respectivamente ($p = 0,2802$). La tasa de RVS en los pacientes con respuesta virológica precoz fue del 79,5%. El índice de recaídas fue similar en ambos grupos, 47,1% en los de 48 sema-

nas vs 32,7% en los 72 semanas, $p = 0,1699$). Se observaron interrupciones del tratamiento en el 9,3% de los pacientes del grupo de 48 semanas y del 23,3% del grupo de 72 semanas, debiéndose a efectos adversos relacionados con los fármacos en el 3,5% y 8,2% de casos respectivamente. El análisis de la cinética viral demostró que solo un subgrupo de respondedores lentos, aquellos con una caída de $< 2 \log$ en los niveles de RNA-VHC a la semana 8 podían beneficiarse de prolongar el tratamiento a 72 semanas.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que 48 semanas de terapia con PEG-IFN alfa-2b y ribavirina (800-1400 mg/día) deben continuar siendo el tratamiento estándar de los pacientes naïve infectados por genotipo 1 y respondedores lentos.

EL "TARGETING" EX VIVO A CÉLULAS DENDRÍTICAS DE UN ADENOVIRUS QUE EXPRESA EL ANTÍGENO NS3 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C AUMENTA SU MADURACIÓN Y LA INDUCCIÓN DE RESPUESTAS ANTIVIRALES IN VITRO E IN VIVO

I. Echeverría, A. Pereboev, L. Silva, A. Zabaleta, J.I. Riezu-Boj, M. Bes, M. Cubero, F. Borrás-Cuesta, J.J. Lasarte, J.I. Esteban, J. Prieto y P. Sarobe

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

Introducción: La eliminación del virus de la hepatitis C se asocia a la inducción de una potente inmunidad celular antiviral. Por ello, la inmunoterapia para el tratamiento de la infección crónica por VHC debería ser capaz de inducir esta respuesta. Puesto que la inducción de respuestas antivirales requiere de una correcta presentación antigénica por las células dendríticas (CD) así como su maduración, nuestro objetivo ha sido el desarrollo de una estrategia que aumente estas propiedades de las CD para mejorar su inmunogenicidad.

Métodos: Con objeto de dirigir un adenovirus recombinante que expresa la proteína NS3 del VHC (AdNS3) a las CD, se construyeron moléculas adaptadoras que contenían el receptor coxackie-adenovirus unido al dominio extracelular de CD40L murino o humano (CFm40L o CFh40L). Se analizó la transducción, maduración e inmunogenicidad in vitro e in vivo de las CD transducidas con AdNS3 en presencia de los adaptadores.

Resultados: La utilización de CFm40L mejoró la transducción de CD, induciendo su maduración, producción de grandes cantidades de IL-12 y un aumento de moléculas co-estimuladoras asociadas a la inducción de respuestas Th1. Asimismo, aumentó claramente la presentación del antígeno NS3 in vitro, activando linfocitos T productores de IFN-gamma. Además, la vacunación de ratones con CD tratadas con CFm40L y AdNS3 indujo potentes respuestas mediadas por linfocitos T CD4 y CD8 frente a NS3. Del mismo modo, CFh40L mejoró la transducción y maduración de CD humanas derivadas de monocitos. La comparación de las CD obtenidas de individuos sanos y de pacientes con hepatitis crónica C, transducidas con AdNS3 en presencia de CFh40L, mostró niveles similares de maduración. Finalmente, la transducción de CD de los pacientes en presencia de CFh40L permitió rescatar la respuesta frente a NS3, al contrario de lo hallado en ausencia del adaptador.

Conclusiones: Estos resultados muestran que esta molécula adaptadora aumenta la eficacia de una vacuna basada en CD transducidas con AdNS3, lo que sugiere que esta estrategia podría aplicarse en la vacunación terapéutica frente al VHC.

EL FN14, UN MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES DEL TNF, ES UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA EN PACIENTES CON HEPATITIS ALCOHÓLICA

M. Domínguez^a, M. Moreno^a, C. Millán^a, J.J. Lozano^a, A. Loeza^a, R. Miquel^b, J. Colmenero^a, J.C. García-Pagán^a, V. Arroyo^a, P. Ginès^a, J. Caballería^a y R. Bataller^a

^aUnidad de Hepatología.

^bUnidad de Patología.

Hospital Clínic. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Barcelona. España.

Introducción: La hepatitis alcohólica (HA) es una complicación severa de los pacientes alcohólicos, con alta mortalidad a corto plazo. La patogénesis de la HA es poco conocida y los tratamientos actuales no son siempre efectivos. Los estudios céntricos que han investigado la efectividad de los bloqueadores del TNF- α han dado resultados negativos. El presente estudio pretende identificar nuevas dianas terapéuticas para estos pacientes.

Métodos: Se incluyó prospectivamente 50 pacientes con HA diagnosticada histológicamente en el Hospital Clínic durante 2008-2009. Se obtuvo datos epidemiológicos, analíticos, clínicos e histológicos. Se analizó el perfil de expresión génica en 20 pacientes y 7 hígados normales mediante microarray (19.152 sondas). Se utilizó los programas GSEA y KEGG para el análisis funcional de los microarrays. Se confirmó la expresión de genes seleccionados mediante PCR cuantitativa. Se utilizó curvas Kaplan-Meier para determinar el valor predictivo de la expresión génica en la supervivencia. El efecto del etanol sobre la expresión de Fn14 se analizó en células estrelladas y en HepG2.

Resultados: La edad media de los pacientes fue de 47 años y el 67% presentaba una HA grave (ABIC \geq 6,71). El análisis de clustering permitió la discriminación de muestras hepáticas (HA vs controles) ($p < 0,001$). El análisis funcional reveló 7 vías funcionales diferentemente reguladas, incluyendo la de la matriz extracelular (24 genes) y la de las citoquinas inflamatorias (33 genes). El análisis detallado de estas vías identificó a los receptores de la superfamilia del TNF (Fn14, receptor OPG, RANK, TRADD, Fas y RhoA) como potenciales determinantes moleculares de la HA. La expresión del TNF- α y de sus receptores 1 y 2 no fue modificada. Se estudió la expresión de componentes de la superfamilia de receptores del TNF en diferentes enfermedades hepáticas (HA, NASH y hepatitis C). Algunos receptores como Fas se encontraron sobreexpresados tanto en NASH como en HA, mientras que Fn14 (receptor de TWEAK) se sobreexpresó únicamente en HA. Además, la expresión hepática

de Fn14 se asoció con mortalidad a 90 días. La expresión de Fn14 en células HepG2 y células estrelladas se incrementó con el tratamiento con etanol (0,1%).

Conclusiones: El análisis funcional de la expresión génica en hígado en pacientes con HA ha permitido la identificación de Fn14 como una posible nueva diana terapéutica. Nuevos estudios experimentales deben investigar el papel funcional de dicha molécula.

CAMBIOS HEMODINÁMICOS Y ESTRATEGIAS DE TRANSFUSIÓN EN PACIENTES CON HEMORRAGIA VARICOSA AGUDA

A. Colomo^{a,b}, V. Hernández-Gea^a, P. Madoz^a, C. Aracil^a, C. Álvarez-Urturi^a, M. Poca^a, M. Concepción^a, J. Gordillo^a, I. Graupera^a, J. Llaó^a, C. Guarner-Argente^a, C. Guarner^{a,b} y C. Villanueva^{a,b}

^aUnidad de Sangrantes. Departamento de Gastroenterología.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

^bCIBERehd. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

Introducción: Con la transfusión de concentrados de hematíes (CH) se persigue evitar las complicaciones isquémicas que pueden derivarse de la anemia. Sin embargo, transfundir en exceso también puede ser perjudicial, y de hecho varios estudios en el contexto de diferentes patologías críticas han demostrado que una estrategia de transfusión más restringida mejora el pronóstico. En el contexto de la hemorragia digestiva aguda (HDA) asociada a la cirrosis, nuestros datos preliminares sugieren que la transfusión restringida mejora el pronóstico de los pacientes.

Objetivos: Explicar nuestros resultados evaluando la relación entre la estrategia de transfusión y los cambios hemodinámicos en pacientes cirróticos con HDA por varices esofágicas.

Métodos: 147 pacientes con cirrosis y HDA varicosa fueron aleatorizados en dos grupos: transfusión restringida (N = 74), en el cual se transfundió con Hb < 70 g/l y transfusión habitual (N = 73) en el cual se transfundió con Hb < 90 g/l. Dentro de las primeras 48 h del episodio agudo se realizó un estudio hemodinámico basal (n = 93), que se repitió 2-4 días más tarde (n = 64).

Resultados: La probabilidad de supervivencia libre de recidiva a los 42 días fue globalmente del 82% y fue significativamente peor de transfusión habitual. Los datos hemodinámicos basales fueron similares en ambos grupos. En comparación con los datos basales, en el grupo transfusión habitual se observó en el segundo estudio hemodinámico un incremento significativo del gradiente de presión portal (GPP) (de $20,6 \pm 4$ a $21,3 \pm 4$ mmHg, $p = 0,03$), presión arterial media ($p = 0,06$) y resistencias vasculares periféricas ($p < 0,01$) y una disminución del índice cardíaco (desde $4,5 \pm 1$ a $4,1 \pm 1$ l/min/m², $p = 0,04$). No se observaron cambios hemodinámicos significativos en el grupo de transfusión restringida. La probabilidad de supervivencia sin recidiva a 42 días fue inferior en aquellos pacientes cuyo GPP descendió en alguna medida ($p = 0,08$). La tasa de pacientes en los que se produjo dicho descenso fue significativamente superior en el grupo de transfusión restringida con respecto al grupo de transfusión habitual. (34% vs 9%, $p = 0,03$).

Conclusiones: en pacientes cirróticos con HDA varicosa, la transfusión habitual provoca un ligero aumento del GPP, que no se observa con transfusión restringida. La tasa de pacientes con descenso del GPP, que se asocia con mejor probabilidad de supervivencia sin recidiva, es mayor en el grupo de transfusión restringida.

EL TRATAMIENTO COMBINADO CON XL647 (INHIBIDOR EGFR/HER2NU/VEGFR) POTENCIA EL EFECTO DE SORAFENIB EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE HEPATOCARCINOMA

B. Mínguez, S. Toffanin, A. Lachenmayer, L. Cabellos, A. Villanueva, A. DiFeo, P. Melgar-Lesmes, S. Thung, S. Friedman y J.M. Llovet

Mount Sinai School of Medicine. New York. EE.UU.

Introducción: La inhibición de kinasas de señalización intracelular con sorafenib es eficaz en el tratamiento del hepatocarcinoma (HCC). La vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) está involucrada en la hepatocarcinogénesis. La combinación de nuevas moléculas con actividad inhibitoria de EGFR con sorafenib sería sinérgica al actuar sobre diferentes vías de señalización implicadas en el desarrollo del HCC.

Objetivos: Investigar el efecto de XL647 (Exelixis), potente inhibidor multikinasa (EGFR/Her-2/VEGFR) de la vía de señalización de EGF, comparado con Erlotinib (inhibidor monokinasa EGFR1) en líneas celulares de HCC y explorar su efecto in vivo en combinación con sorafenib en un modelo xenograft de HCC.

Métodos: Tres líneas celulares de HCC (HuH7, Hep3B y HepG2) se incubaron a concentraciones crecientes de XL647 y erlotinib. Evaluamos viabilidad celular (MTT), proliferación celular (incorporación de 3[H]-timidina), ciclo celular (FACS) y activación de EGFR (Western Blot). Desarrollamos un modelo xenograft mediante inyección subcutánea de 4×10^6 células HuH7 en 55 ratones atímicos, estratificados en 5 tratamientos: Control (n = 8), XL647 [30 mg/kg/d] (n = 11), Erlotinib [100 mg/kg/d] (n = 10), sorafenib [30 mg/kg/d] (n = 11), y la combinación XL647 + sorafenib [XL+S] [30 mg/kg/d] (n = 15). Evaluamos crecimiento tumoral, supervivencia y toxicidad.

Resultados: Tras 48h de incubación, XL647 [30μM] mostró un potente efecto inhibitorio de la viabilidad celular comparado con erlotinib (45-76% vs 86-112%, p = 0,02), y mayor descenso en proliferación celular (< 1% con XL647 vs 42-82% con erlotinib, p = 0,039). XL647 produjo un incremento de apoptosis y arresto celular en G1. XL647 bloqueó la fosforilación de EGFR1 y ERK, disminuyendo la fosforilación de Akt y S6. In vivo, [XL+S] retrasó significativamente la progresión tumoral comparado con el grupo control (p ≤ 0,002) y el resto de tratamientos (p ≤ 0,02) (volúmenes tumorales en mm³ a 13 días de tratamiento: [XL+S] 354, erlotinib 656, sorafenib 738, XL647 670 y control 1103). [XL+S] aumentó la supervivencia (26 días vs control 12 días, p ≤ 0,0001). Todos los tratamientos fueron bien tolerados.

Conclusiones: XL647 produce un mayor descenso en viabilidad y proliferación celular e induce apoptosis in vitro comparado con erlotinib. La combinación XL647 con sorafenib in vivo es bien tolerada y produce un efecto sinérgico, retrasando el crecimiento tumoral y aumentando la supervivencia en un modelo xenograft de HCC.

LA ADMINISTRACIÓN DE CARDIOTROFINA-1 REDUCE LA LESIÓN DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN E INCREMENTA LA SUPERVIVENCIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TRASPLANTE HEPÁTICO ORTOTÓPICO

P. Aguilar-Melero^a, M.C. Pérez-Manrique^b, A.B. Hidalgo^a, A. Luque^b, A. Naranjo^b, I.C. Rodríguez^a, F.J. Briceño^a, M. Bustos^c, A. Poyato^a, H.C.Y. Chang^d, M. Iñiguez^e, V. Fernández-Gallego^c, J. Ruiz^c, J. Prieto^{d,e}, M. de la Mata^{a,e}, J. Muntané^{a,e} y P. López-Cillero^{b,e}

^aLiver Research Unit.

^bSurgery Department. Reina Sofía University Hospital. Córdoba. España.

^cDigna Biotech. Madrid. España.

^dCIMA. University of Navarra. Pamplona. España.

^eCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREH o Ciberehd). Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

Introducción: El trasplante hepático ortotópico (THO) es el tratamiento de elección en enfermedades hepáticas avanzadas. Existe un número importante de pacientes en lista de espera de THO, y un porcentaje elevado de órganos donantes sub-óptimos. La cardiotrofina-1 (CT-1) ejerce un efecto citoprotector en diferentes modelos experimentales de lesión hepática.

Objetivos: Evaluación del efecto de la CT-1 en un modelo experimental de THO.

Métodos: CT-1 (250 μg/Kg p.c.) se administró a mini-pigs (n = 15, 10-15 kg) sometidos a THO. Se obtuvieron biopsias hepáticas a diversos tiempos (antes de la extracción del órgano, durante isquemia fría, después de la reperfusión y en la muerte/sacrificio del animal). La sangre se obtuvo del donante, y del receptor antes y después (0,5, 1, 3, 6, 12, 18 y 24 horas) de la reperfusión.

Resultados: La administración de CT-1 a donantes incrementa el porcentaje de animales que sobreviven hasta las 24 horas tras THO en comparación con la administración en donante + receptor y control (62%, vs 36% y 25%, respectivamente). CT-1 administrada en donantes mejora la histología de las secciones hepáticas en el momento del sacrificio/muerte del animal y reduce ALT comparado con su administración en donante + receptor y control (52 ± 7,3 IU/L vs 72 ± 6,0 IU/L y 156 ± 28,7 IU/L, respectivamente), así como recupera los parámetros de metabolismo proteico y presión arterial media. La mejora con CT-1 se relaciona con la reducción de malondialdehído (MDA) e incremento del cociente GSH/GSSG en hígado.

Conclusiones: 1) La administración de CT-1 a donantes es útil para reducir la lesión hepática, estrés oxidativo, mejora de la hemodinámica y la supervivencia en un modelo experimental de THO.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALBÚMINA EN PACIENTES CON CIRROSIS E INFECCIONES BACTERIANAS DISTINTAS DE LA PBE. ESTUDIO COMPARATIVO ALEATORIZADO

M. Guevara, A. Nazar, C. Terra, M. Martín-Llahí, M.E. Baccaro, M. Pavesi, M. Marinelli, E. Urtasun, J. Fernández, V. Arroyo y P. Ginès

Hospital Clínic. Universidad de Barcelona. CIBEREHD (Ciber de Enfermedades Hepáticas y Digestivas) e IDIBAPS. Barcelona. España.

La administración de albúmina previene el desarrollo de insuficiencia renal y mejora la supervivencia en pacientes con cirrosis y peritonitis bacteriana espontánea (PBE). Sin embargo, no existen estudios que hayan investigado el efecto de la albúmina en pacientes con cirrosis e infecciones bacterianas distintas de la PBE. Con este objetivo se aleatorizaron 110 pacientes con cirrosis e infecciones distintas de la PBE para recibir tratamiento antibiótico (54 pa-

cientes) o antibióticos más albúmina (1,5 g/kg en el momento del diagnóstico y 1 g/kg al tercer día; 56 pacientes). Los cambios en la función renal se evaluaron usando el filtrado glomerular estimado (MDRD). La función circulatoria se evaluó mediante la determinación de la actividad del sistema renina-aldosterona y del sistema nerviosos simpático. Se evaluó la supervivencia a los 3 meses. La infección se resolvió en la mayoría de los pacientes (98% vs 92% albúmina vs no albúmina, p: ns) La administración de albúmina se asoció con una mejoría de la función circulatoria estimada por una disminución en la aldosterona sérica (grupo albúmina: 48 ± 50 ng/dL al diagnóstico vs 34 ± 36 a la resolución; grupo no albúmina 47 ± 60 vs 74 ± 110 , respectivamente; $p = 0,068$) y en la norepinefrina plasmática (albúmina: 331 ± 235 pg/mL vs 251 ± 152 ; no albúmina: 282 ± 144 vs 331 ± 288 , respectivamente, $p = 0,065$). El filtrado glomerular mejoró después del tratamiento en los pacientes trata-

dos con albúmina en comparación con el grupo sin albúmina (albúmina: 68 ± 36 ml/min vs 88 ± 46 ; no albúmina: 78 ± 33 vs 79 ± 33 , respectivamente, $p = 0,002$). Sin embargo no hubo diferencias entre los 2 grupos con respecto al número de pacientes que tenía insuficiencia renal en el momento del diagnóstico y mostraron mejoría de la función renal después del tratamiento (albúmina: 9/13, 69%, vs no albúmina 4/10, 40%) ni en el número de pacientes sin insuficiencia renal al diagnóstico que la desarrollaron durante la infección (3 y 4 pacientes, respectivamente). La probabilidad de supervivencia a los 3 meses fue similar en ambos grupos (80 vs 78%, respectivamente) En conclusión la administración de albúmina a pacientes con cirrosis e infecciones bacterianas distintas de la PBE mejora la función circulatoria y renal pero no se asocia a una disminución en la incidencia de insuficiencia renal y no mejora la supervivencia.