

## COMUNICACIONES ORALES

### XXXIV Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 25-27 de febrero de 2009

#### Sesión general 1

Moderadores: Martín Prieto (Valencia) y Trinidad Serrano (Zaragoza)

#### COMPARACIÓN ENTRE ELASTOGRAFÍA TRANSITORIA Y VALORACIÓN ECOGRÁFICA DEL MARGEN HEPÁTICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE CIRROSIS E HIPERTENSIÓN PORTAL

A. Berzigotti<sup>a,b</sup>, E. Llop<sup>a</sup>, E. Erice<sup>a</sup>, R. Gilabert<sup>b</sup>, J.G. Abraldes<sup>a</sup>, J.C. García-Pagan<sup>a</sup> y J. Bosch<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hemodinámica Hepática. Liver Unit. Hospital Clínic. IDIBAPS and Ciberehd. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Centre de Diagnostic per l'Imatge. Hospital Clínic. IDIBAPS and Ciberehd. Barcelona. España.

**Introducción:** La cirrosis hepática (CH) se caracteriza por la presencia de fibrosis y nódulos. La elastografía transitoria (ET) es un método no invasivo que valora la rigidez hepática, que en las hepatopatías aumenta por la fibrosis e inflamación, y es útil en el diagnóstico de CH y de hipertensión portal clínicamente significativa (CSPH). La valoración ecográfica del margen hepático (MHI) permite observar la presencia de nódulos y, por tanto, el diagnóstico de cirrosis. En este trabajo comparamos el valor diagnóstico de estos dos métodos.

**Métodos:** En 82 pacientes con sospecha clínica de cirrosis enviados para la medición del gradiente de presión venosa hepática (GPVH) ± biopsia transjugular (BTY) realizamos una valoración eco-gráfica del MHI con transductor lineal de alta frecuencia (10 MHz) y valoración de la rigidez hepática por ET (Fibroscan®). El margen hepático se clasificó como liso (normal), irregular (indeterminado) o nodular (CH). Las imágenes adquiridas se procesaron digitalmente para obtener un valor numérico de longitud del MHI. La rigidez hepática se clasificó según la literatura: valores < 12 kPa descartarían CH, 12-18 kPa serían indeterminados, y ≥ 18 kPa diagnósticos de CH. Valores ≥ 13,6 kPa se consideraron diagnósticos de CSPH. Para el análisis estadístico los fallos técnicos se consideraron como indeterminados (ET: 12 vs MHI: 1; p < 0,01). El GPVH se evaluó por cateterismo; un GPVH ≥ 10 mmHg define CSPH. El diagnóstico de cirrosis se estableció por histología (disponible en 74), o por datos clínicos + hipertensión portal.

**Resultados:** Se diagnosticó cirrosis en 39 pacientes y CSPH en 45. En el diagnóstico de cirrosis la AUROC de ET fue 0,91 (95% CI 0,85-0,98), p < 0,0001, y la de MHI 0,88 (95% CI 0,80-0,96), p < 0,0001. Para el diagnóstico de CSPH la AUROC de ET fue 0,91 (95% CI 0,84-0,98), p < 0,0001, y la de MHI 0,82 (95% CI 0,73-0,92), p < 0,0001. La validez diagnóstica de ET, MHI y de ambas se detalla en la tabla.

**Conclusiones:** La aplicabilidad de MHI es muy superior a la de ET. En pacientes con sospecha clínica de CH, el hallazgo de un margen

	CIRROSIS	% pacientes	Likelihood Ratio (95% CI)	(LR) CSPH	+ LR (95% CI)	- LR (95% CI)
ET	CH (≥ 18 kPa)	39	4,78 (2,49-9,17)	MHI Nodular	≥ 13,6 kPa	2,86 (1,66-4,95)
	Indeterminada/ fallo técnico (12-18 kPa)	27	1,10 (0,60-2,01)			0,15 (0,07-0,30)
	No CH (< 12 kPa)	34	0,08 (0,03-0,27)			
	CH (nodular)	37	9,92 (3,89-25,29)		11,20 (3,55-35,37)	0,28 (0,14-0,56)
MHI	Indeterminada/ fallo técnico (irregular)	35	0,58 (0,34-0,99)			
	No CH (liso)	28	0,11 (0,03-0,34)			
	CH	42	8,27 (3,72-18,38)	ET + MHI	12,80 (4,07-40,21)	0,11 (0,05-0,25)
ET + MHI	Indeterminada/ fallo técnico	18	0,96 (0,45-2,09)			
	No CH	40	0,07 (0,02-0,22)			

nodular es la mejor técnica no invasiva para diagnosticar CH; en cambio, la ET es preferible para descartar CH. La combinación de ambas ofrece el mayor valor diagnóstico.

#### DISMINUCIÓN DEL VOLUMEN CEREBRAL TRAS EL TRASPLANTE HEPÁTICO: INICIALMENTE EDEMA CEREBRAL, A LARGO PLAZO UN PROCESO NEURODEGENERATIVO

R. García-Martínez<sup>a</sup>, J. Córdoba<sup>a</sup>, J. Alonso<sup>b</sup> y A. Rovira<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Medicina Interna-Hepatología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Unidad de Resonancia Magnética. Servicio de Radiología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

**Introducción:** Factores asociados al trasplante hepático (TH), como hipertensión arterial, diabetes, inmunosupresión, encefalopatía hepática (EH) pre-TH, etc. pueden ocasionar complicaciones neurológicas, frecuentes en los primeros meses. Sin embargo, se desconocen las secuelas neurológicas a largo plazo.

**Objetivo:** Evaluar la estructura y función cerebrales en el seguimiento a largo plazo tras el TH.

**Materiales y métodos:** Treinta y seis pacientes sometidos a TH entre abril de 1998 y diciembre de 2001 fueron incluidos en un estudio prospectivo. Dieciocho pacientes vivos (edad:  $65 \pm 8$  años; 16 hombres; VHC: 9, alcohol: 4, VHC + alcohol: 4, otros: 1) con buena función hepática (ALT  $44 \pm 35$  UI/L, bilirrubina  $0,7 \pm 0,3$  mg/dL, INR  $1 \pm 0,1$ ) fueron reevaluados 7,7 años después del TH. Todos fueron evaluados en el período pre-TH (pre-TH), 6-12 meses (post-TH precoz) y 7-10 años post-TH (post-TH tardío). Se midió por resonancia magnética el volumen de los ventrículos (VV, un índice indirecto del volumen cerebral) y el volumen de las lesiones focales de la sustancia blanca (LFSB, un índice de enfermedad vascular cerebral de pequeño vaso). Se realizaron test neuropsicológicos para evaluar atención (Symbol digit), función motora (Grooved pegboard), función ejecutiva (Hooper) y memoria (Auditory verbal learning).

**Resultados:** **Post-TH precoz:** Se observó un incremento del 8% en el VV, junto a una disminución del 20% en las LFSB. Estos cambios, atribuibles a la desaparición del edema cerebral pre-TH, se asociaron a mejoría de los test neuropsicológicos. **Post-TH tardío:** El VV se incrementó un 60%, las LFSB aumentaron un 25% y se observó un deterioro de test de memoria. El incremento de las LFSB ( $> 15\%$ ) se asoció a una mayor necesidad de tratamiento antihipertensivo (88 vs 33%) y niveles superiores de creatinina ( $1,37 \pm 0,21$  vs  $1,19 \pm 0,15$  mg/dL,  $p = 0,06$ ).

**Conclusiones:** Tras el TH se observa inicialmente una disminución del volumen cerebral y una mejoría neuropsicológica. Estos cambios corresponden a una mejoría del edema cerebral y de la EH

mínima pre-TH. A largo plazo, se produce una disminución del volumen cerebral, que es superior a la esperable en la población general y que se asocia a signos de lesión vascular de pequeño vaso. El control de los factores de riesgo vascular parece ser crucial en la prevención del deterioro neurológico pos-TH.

#### EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIÁLISIS CON ALBÚMINA (MARS) SOBRE LA CARGA VIRAL EN LA RECURRENCIA DE LA HEPATITIS C EN PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS

B. Merino Rodríguez<sup>a</sup>, M. Salcedo Plaza<sup>a</sup>, M. Vega Catalina Rodríguez<sup>a</sup>, D. Rincón Rodríguez<sup>a</sup>, M. Carmela Solmone<sup>b</sup>, O. Lo Iacono<sup>c</sup>, G. Clemente Ricote<sup>a</sup> y R. Bañares Cañizares<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hepatología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

<sup>b</sup>Laboratorio de Virología INMI Lazaro Spallanzani. Roma. Italia.

<sup>c</sup>Hospital del Tajo. Madrid. España.

**Introducción:** En los pacientes con insuficiencia renal crónica y hepatitis C la hemodiálisis convencional condiciona el curso de la enfermedad hepática, disminuyendo la carga viral (CV) y el desarrollo de fibrosis. La recidiva de la hepatitis C en el trasplante hepático (TH) tiene un curso acelerado con una CV marcadamente elevada. Datos preliminares indican que determinados procedimientos de circulación extracorpórea, como la leucocitaféresis y la plasmaférésis con doble filtración, pueden utilizarse como adyuvantes al tratamiento antiviral (TAV) en pacientes con hepatitis C con mal perfil de respuesta inicial (genotipo 1, alta CV).

**Objetivo:** Evaluar los efectos del tratamiento con diálisis de albúmina (MARS) sobre la CV en pacientes con TH y recidiva grave del VHC. Analizar la presencia viral en el sistema MARS. Valorar el MARS como adyuvante al tratamiento antiviral (TAV) en este grupo de pacientes.

**Material y métodos:** Estudio observacional de TH con recurrencia grave de la hepatitis C. Se cuantificó la CV antes y después de la realización de 3 sesiones MARS. En 6 pacientes se analizó la CV en los distintos elementos del circuito de diálisis. Tras finalizar el MARS se inició TAV (interferón pegilado y ribavirina) lo más precozmente posible, en función de la situación clínica del paciente.

**Resultados:** Entre agosto de 2005 y octubre de 2007 se incluyó a 6 pacientes con TH y recidiva grave del VHC (todos genotipo 1; edad media 49,3 [4,5] años). La mediana de tiempo desde el TH hasta el inicio del tratamiento MARS fue de 8 meses. Tras el MARS se produjo un descenso significativo de la CV ( $7,3 [0,65] \log$  Vs  $6,07 [0,64] \log$ ;  $p = 0,001$ ). Al cuantificar la CV en las distintas partes del circuito de diálisis, tras finalizar las sesiones, se encontraron altas concentraciones virales (media 6 log) en la membrana MARS pero no en el circuito intermedio del dispositivo. No se produjeron complicaciones en relación con el procedimiento MARS. Al finalizar la diálisis de albúmina se produjo una mejoría significativa de la función hepática (GOT 380 [8,2], GPT 248 [12,2], Bt 35,6 [4,3], INR 2,6 [0,8] Vs GOT 210 [9,4], GPT 180 [10,3], Bt 14,5 [3,8], INR 2,1 [0,2];  $p < 0,05$ ). La mediana de tiempo desde la finalización del MARS hasta el inicio del TAV fue de 6 días. Un paciente logró respuesta virológica sostenida; tres presentaron respuesta virológica tardía por lo que continúan en tratamiento de mantenimiento; en un paciente se suspendió por toxicidad medular a las 16 semanas y otro falleció por una infección por citomegalovirus al mes de iniciar el TAV.

**Conclusiones:** El MARS produce un descenso significativo de la CV del virus C en probable relación con una adsorción del virus en la membrana, por lo que podría considerarse un tratamiento coadyuvante al TAV en pacientes con TH y recidivas graves del virus C, subgrupo con mal perfil de respuesta. Es necesaria la realización de estudios con un mayor número de pacientes para confirmar estos resultados.

	Pre-TH	Post-TH precoz	Post-TH tardío	ANOVA medidas repetidas
VV cm <sup>3</sup>	23227 (17686)	26664 (17840)	32906 (18255) ¶	0,06
LFSB cm <sup>3</sup>	1199 (781)	760 (503)	1373 (731) ¶¶	0,02
ATENCIÓN	31 ± 13	40 ± 10 ¶	40 ± 12 ¶	< 0,001
F. MOTORA	96 ± 27	81 ± 25 ¶	82 ± 20 ¶	< 0,001
F. EJECUTIVA	23 ± 5	26 ± 2 ¶	25 ± 3	0,03
MEMORIA	36 ± 8	44 ± 11 ¶	39 ± 10 ¶¶	0,001

Mediana o media ± DE, post-hoc test  $p < 0,05$ ; ¶ vs pre-TH, ¶¶ vs post-TH precoz

## EL ÍNDICE DE MELD-SODIO ES UN BUEN PREDICTOR DE MORTALIDAD EN PACIENTES CIRRÓTICOS CON PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA

J. Castellote, A. Girbau, S. Salord, J. Ariza, C. Pons, S. Maisterra, R. Rota, C. Ballellas y X. Xiol

Unidad de Hepatología. Servicio de Aparato Digestivo. IDIBELL. Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona. España.

**Introducción:** En los últimos años, el índice MELD y su derivado, el índice de MELD-sodio, se han extendido como índices de función hepática imprescindibles para la toma de decisiones clínicas.

**Objetivo:** Valorar la utilidad de ambos índices junto a diferentes variables demográficas, analíticas y microbiológicas como factores pronósticos de mortalidad en pacientes cirróticos con peritonitis bacteriana espontánea (PBE).

**Material y métodos:** Se han estudiado 150 episodios de PBE en 127 pacientes, que se incluyeron prospectivamente en 3 estudios de diagnóstico de PBE durante los años 2001-2007. El diagnóstico de PBE se realizó cuando el número de PMN en líquido ascítico fue  $\geq 250/\mu\text{L}$  sin otra causa intrabdominal quirúrgica. Todos los pacientes se trataron empíricamente con cefalosporinas de tercera generación, ajustando posteriormente el tratamiento a la sensibilidad del cultivo. El cultivo de líquido ascítico fue positivo en el 50,7% de los casos. La mortalidad durante el ingreso se produjo en 32 casos, 21,3%. En el análisis univariante 15 variables analíticas y microbiológicas resultaron con valor predictivo de mortalidad. Se practicó un análisis de regresión logística múltiple que identificó a la urea en el momento de la infección (OR 2,94; IC 95%: 1,68-5,14), el desarrollo de insuficiencia renal durante la infección (OR 6,55; IC 95%: 3,70-11,62) y el índice de MELD-sodio (OR 14,82; IC 95%: 6,77-32,49) como factores independientes predictivos de mortalidad. En una curva tipo ROC el índice de MELD-sodio presentó un área bajo la curva de 0,833 (IC 95%: 0,755-0,912). Un punto de corte de 24,09, selecciona un grupo de bajo riesgo de mortalidad (3/74, 4,1%) y otro de alto riesgo de mortalidad (27/74, 36,5%).

**Conclusión:** La función renal en el momento y durante la infección son factores predictivos de mortalidad en los pacientes cirróticos con peritonitis bacteriana espontánea. El índice de MELD-sodio es un potente predictor de mortalidad durante el ingreso y permite identificar 2 poblaciones con alto y bajo riesgo de mortalidad.

## LA PROTEÍNA X DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B INHIBE LA UBIQUITINIZACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LA PROTEÍNA PITUITARY TUMOR TRANSFORMING GENE 1

F. Molina-Jiménez<sup>a,g</sup>, I. Benedicto<sup>a,g</sup>, S. Martín-Vilchez<sup>b,g</sup>, J.A. Pintor-Toro<sup>c</sup>, J.L. Barbero<sup>d</sup>, M. Tortolero<sup>e</sup>, R. Moreno-Otero<sup>b,g</sup>, P.L. Majano<sup>a,g</sup> y M. López-Cabrera<sup>a,f,g</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Biología Molecular. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid. España.

<sup>b</sup>Unidad de Hepatología. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid. España.

<sup>c</sup>Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa. CABIMER. Sevilla. España.

<sup>d</sup>Departamento de Biología Celular y del Desarrollo. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Madrid. España.

<sup>e</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Sevilla. España.

<sup>f</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC. Madrid. España.

<sup>g</sup>CIBER-ehd, Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

**Introducción:** La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) es uno de los principales agentes causantes del hepatocarcinoma (HCC). La capacidad oncocéntrica de VHB reside, al menos en parte, en el efecto de la proteína viral HBx sobre la proliferación y el ciclo celular. Pituitary Tumor Transforming Gene 1 (PTTG1)/Securina,

proteína implicada en la malignización tumoral y tumorogénesis, se sobreexpresa en HCC pudiendo ser utilizados sus niveles de expresión como pronóstico de supervivencia. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar el efecto de HBx sobre PTTG1 en células derivadas de hepatocitos humanos.

**Materiales y métodos:** Estudiamos el efecto de HBx sobre PTTG1 analizando los niveles de expresión, ubiquitinización y degradación mediante RT-PCR cuantitativa, inmunoprecipitación, western blot y pull down en líneas celulares derivadas de hepatocitos que expresan HBx de manera dependiente de tetraciclina.

**Resultados:** A pesar de no aumentar significativamente la expresión de ARN mensajero ni la activación del promotor de PTTG1, HBx aumenta los niveles de la proteína. PTTG1 se degrada por el proteosoma cuando es ubiquitinizada por APC/ciclosoma en mitosis y por el complejo SCF en interfase. Para que SCF reconozca como substrato PTTG1, ésta debe estar hiperfosforilada y esto ocurre cuando la proteína fosfatasa PP2A está inactiva. En este trabajo demostramos que HBx produce una acumulación de formas hiperfosforiladas de PTTG1 en presencia de ácido okadaico, un inhibidor de PP2A, sugiriendo que está inhibiendo la degradación de PTTG1 cuando está marcada para degradación. Demostramos, además, que la ubiquitinización, pero no la degradación por el proteosoma, de PTTG1 está inhibida en células que expresan HBx. Mediante ensayos de pull down vimos que HBx interacciona con parte del complejo proteíco SCF-PTTG1, posiblemente inhibiendo su correcto ensamblaje, así como el reconocimiento y ubiquitinización de PTTG1.

**Conclusión:** HBx inhibe la degradación de PTTG1, aumentando así sus niveles. Estos datos podrían ayudar a explicar la capacidad oncocéntrica de las proteínas del VHB HBx.

## SUPERVIVENCIA POSTRASPLANTE HEPÁTICO EN PACIENTES CON COINFECCIÓN VIH-VHC. RESULTADOS PRELIMINARES DE UN ESTUDIO MULTICÉNTRICO ESPAÑOL DE CASOS Y CONTROLES

A. Rimola<sup>a</sup>, A. Montejó<sup>b</sup>, L. Castells<sup>c</sup>, J.C. Meneu<sup>d</sup>, A. Rafecas<sup>e</sup>, M. Blanes<sup>f</sup>, J. Fortún<sup>g</sup>, P. Miralles<sup>h</sup>, J. de la Torre<sup>i</sup>, R. Lozano<sup>i</sup>, A. Moreno<sup>a</sup>, G. de la Rosa<sup>j</sup>, I. Iñaki Pérez<sup>a</sup> y J.M. Miró<sup>a</sup>; y el Grupo de Estudio de TOH en VIH

<sup>a</sup>Hospital Clínic-IDIBAPS. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Hospital de Cruces. Bilbao. España.

<sup>c</sup>Hospital Universitari Vall d'Hebrón. Barcelona. España.

<sup>d</sup>Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. España.

<sup>e</sup>Hospital de Bellvitge-IDIBELL. Barcelona. España.

<sup>f</sup>Hospital La Fe. Valencia. España.

<sup>g</sup>Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

<sup>h</sup>Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

<sup>i</sup>Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. España.

<sup>j</sup>Organización Nacional de Trasplantes. Madrid. España.

Los estudios previamente publicados acerca de la supervivencia en pacientes receptores de trasplante hepático (TH) con coinfección por VIH y VHC son unicéntricos e incluyen pocos enfermos.

**Objetivos:** 1) Determinar la supervivencia post-TH en un número elevado de pacientes coinfecados VIH-VHC, trasplantados en distintos centros y compararla con la de pacientes monoinfecados VHC, y 2) identificar factores pronósticos en pacientes coinfecados VIH-VHC.

**Pacientes:** a) 81 pacientes coinfecados VIH-VHC, receptores de TH durante 2002-2006, trasplantados en 17 centros españoles, seguidos hasta diciembre de 2007, e incluidos en la base de datos del estudio FIPSE OLT-HIV-05-GESIDA 45-05; b) 243 pacientes monoinfecados VHC, seleccionados del Registro Español de Trasplante Hepático, y pareados con los del grupo A (proporción 3:1) según edad ( $\pm 12$  años), sexo, centro, año de trasplante ( $\pm 1$  año), coinfección por VHB y hepatocarcinoma.

**Métodos:** a) Se calculó la supervivencia post-TH en ambos grupos (Kaplan-Meier; comparación: log rank test); b) en el grupo de pacientes coinfecados VIH-VHC se investigaron distintas variables pre- y peri-TH como posibles factores predictivos de mortalidad post-TH (regresión de Cox).

**Resultados:** La probabilidad de supervivencia de los pacientes coinfecados VIH-VHC y de pacientes monoinfecados VHC fue de 87 vs 89%, respectivamente, a 1 año del TH, 62 vs 77% a 3 años, y 48 vs 75% a 5 años ( $p < 0,01$ ). En los pacientes coinfecados VIH-VHC, el genotipo 1 del VHC, MELD elevado, no identidad ABO entre donante y receptor, causa de muerte encefálica no traumática en el donante y transfusión perioperatoria elevada se asociaron significativamente ( $p < 0,05$ ) a un riesgo incrementado de mortalidad post-TH.

**Conclusiones:** La supervivencia post-TH a corto plazo de pacientes coinfecados VIH-VHC es similar a la de pacientes monoinfecados VHC. Sin embargo, a mediano plazo la supervivencia es sustancialmente menor en los pacientes coinfecados VIH-VHC. Diversas variables pre- y peri-TH tienen valor como factores predictores de mortalidad post-TH, lo que podría tener importancia en la selección de candidatos coinfecados VIH-VHC para TH y de sus donantes.

#### VALIDACIÓN PROSPECTIVA DE UN ÍNDICE PREDICTIVO DE FIBROSIS EN TRASPLANTADOS POR VHC. COMPARACIÓN CON OTROS ÍNDICES PREDICTIVOS

S. Benlloch<sup>a</sup>, J.M. Rayón<sup>a</sup>, M. Prieto<sup>a</sup>, R. Pina<sup>a</sup>, V. Aguilera<sup>a</sup>, L. Heredia<sup>b</sup>, A. Rubín<sup>a</sup> y M. Berenguer<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Medicina Digestiva-Trasplante Hepático. Hospital Universitario La Fe. Valencia. España.

<sup>b</sup>Anatomía Patológica. Hospital Universitario La Fe. Valencia. España.

En pacientes receptores de un trasplante hepático (TH) por cirrosis secundaria al virus de la hepatitis C (VHC), la biopsia hepáti-

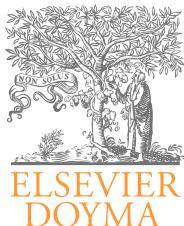
ca por protocolo (BHP) es la mejor forma de monitorizar la fibrosis hepática producida por la recurrencia del virus en el injerto, pero al ser una prueba invasiva, son deseables marcadores no invasivos de fibrosis en estos pacientes.

**Objetivos:** Validar de forma prospectiva un modelo matemático simple creado por nuestro grupo para predecir la probabilidad de fibrosis significativa (FS) en receptores de un TH por cirrosis VHC y compararlo con otros índices predictivos.

**Métodos:** Se recogieron de forma prospectiva durante 2,7 años los datos analíticos e histológicos de pacientes trasplantados por VHC que eran sometidos a una BHP. Se midió la variabilidad intra/interobservador. Se aplicaron los índices de nuestro grupo (publicado en 2005), índice de Forns e índice APRI para predecir FS y se evaluó su capacidad diagnóstica mediante curvas ROC.

**Resultados:** Se incluyeron 93 BHP practicadas a 86 pacientes trasplantados. La concordancia intraobservador e interobservador fueron altas (Kappa = 0,94 y 0,75, respectivamente). Los valores predictivos y áreas bajo la curva ROC de los diferentes índices es inferior a la publicada en los estudios originales. Para puntos de corte bajos, el índice de nuestro centro es el mejor para descartar FS, seguido por APRI y el de Forns. Para puntos de corte altos, el índice de APRI es el mejor para detectar FS. El área bajo la curva ROC de los índices de nuestro grupo, Forns y APRI para la detección de FS fue de 0,68, 0,62 y 0,73, respectivamente. Nuestro índice predictivo no mejoró tras incorporar las variables edad del donante e índice de masa corporal. La combinación de nuestro índice con el de APRI obtuvo un valor predictivo negativo del 88,2% y permitió clasificar correctamente a un mayor porcentaje de pacientes, con mayor porcentaje de biopsias que se podrían haber ahorrado (36%).

**Conclusiones:** En este trabajo se ha validado un índice predictivo de fibrosis basado en variables fáciles de obtener en la práctica clínica diaria, que permite diferenciar un subgrupo de pacientes trasplantados por VHC en quienes se puede evitar la BHP por la baja probabilidad de hallar fibrosis significativa.



# Gastroenterología y Hepatología

[www.elsevier.es/gastroenterologia](http://www.elsevier.es/gastroenterologia)



## COMUNICACIONES ORALES

### XXXIV Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 25-27 de febrero de 2009

#### Sesión general 2

Moderadores: Fco. Javier García Samaniego (Madrid) y María Jover (Sevilla)

#### EL ÁCIDO LITOCÓLICO DISMINUYE LA SUPERVIVENCIA Y MODIFICA LOS EFECTOS DE LA VITAMINA D<sub>3</sub> EN OSTEBLASTOS HUMANOS PRIMARIOS

S. Ruiz-Gaspà, A. Enjuanes, N. Guañabens, P. Peris, A. Martínez-Ferrer, M.J. Martínez de Osaba, L. Álvarez, A. Monegal, A. Combalia, B. González y A. Parés

Unidades de Hepatología y de Patología Metabólica Ósea. Hospital Clínic. IDIBAPS, CIBEREHD. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

Los mecanismos causantes de la baja formación ósea en pacientes con colestasis crónica no están bien definidos. Algunos datos indican que la osteopenia se asocia con la gravedad y la duración de la colestasis crónica, pero los mecanismos responsables del desarrollo de osteoporosis son desconocidos. Potencialmente, los ácidos biliares retenidos podrían afectar, no solamente a los hepatocitos y colangiocitos, sino también los osteoblastos, y en consecuencia contribuir al desarrollo de osteoporosis en los pacientes con colestasis crónica. El objetivo del estudio fue analizar el efecto del ácido litocólico (LCA) sobre la supervivencia y la expresión de genes relacionados con la vía metabólica de la vitamina D<sub>3</sub> (VitD<sub>3</sub>) y maduración celular, en osteoblastos humanos (hOB) primarios. Los hOB se obtuvieron de hueso trabecular procedente de 10 pacientes intervenidos de prótesis total de cadera por coxartrosis. Se cultivaron en DMEM/HAM F-12 con 10 microg/ml de ácido ascórbico y 10% de FBS. Los hOB se trataron durante 6, 24, 48, y 72 h con LCA (10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, y 10<sup>-3</sup> M), con y sin VitD<sub>3</sub> (10<sup>-7</sup> M). La supervivencia se determinó mediante un método colorimétrico (Kit WST-1, Roche). La expresión génica de Vitamina D 24-hidroxilasa (CYP24A), osteocalcina (BGLAP), RANKL (TNFSF11) y osteoprotegerina (TNFRSF11B), indicadores del metabolismo de la VitD<sub>3</sub>, maduración osteoblástica, y diferenciación y activación osteoclástica, respectivamente, se cuantificó mediante PCR a tiempo real. El LCA (10<sup>-3</sup> M) se asoció a una significativa disminución de la supervivencia de los hOB ( $p < 0.001$ ). Este efecto se redujo parcialmente en presencia de FBS o albúmina humana. Los siguientes experimentos se realizaron a concentraciones de LCA no letales. Tal como se esperaba, la VitD<sub>3</sub> estimuló la expresión génica de Cyp24A, BGLAP y TNFSF11 en oste-

oblastos. La adición de LCA al medio modificó el efecto de la vitamina D, evidenciado por una disminución significativa ( $p < 0.02$ ) de la expresión génica de CYP24A, BGLAP y TNFSF11 del -72%, -74% y -56%, respectivamente. El tratamiento únicamente con LCA tuvo un efecto similar al de la VitD<sub>3</sub>, produciendo un incremento parcial de la expresión génica de CYP24A y BGLAP pero sin cambios en TNFRSF11B. En conclusión, el LCA disminuye el efecto estimulador de la VitD<sub>3</sub> sobre la expresión génica de CYP24A, BGLAP y TNFSF11 en hOB. Estos resultados explicarían, en parte, el efecto nocivo de la retención de ácidos biliares sobre el remodelado óseo en pacientes con colestasis crónica y, en consecuencia, del desarrollo de osteoporosis.

#### EVALUACIÓN PRONÓSTICA DE MORTALIDAD A LAS 6 SEMANAS TRAS UNA HEMORRAGIA POR VARICES ESOFÁGICAS MEDIANTE ÁRBOLES DE DECISIÓN TIPO CART

S. Augustin<sup>a</sup>, L. Muntaner<sup>a</sup>, J.T. Altamirano<sup>a</sup>, A. González<sup>a</sup>, J. Dot<sup>b</sup>, M. Abu-Suboh<sup>b</sup>, E. Saperas<sup>c</sup> y J. Genescà<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Medicina Interna-Hepatología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Servicio de Endoscopia Digestiva. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

<sup>c</sup>Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

**Introducción:** Los modelos pronósticos disponibles de mortalidad tras un episodio de hemorragia por varices esofágicas se basan fundamentalmente en análisis multivariado de regresión logística (RL). Sin embargo, dichos modelos presentan limitaciones metodológicas que dificultan su aplicación clínica.

**Objetivo:** Evaluar la capacidad pronóstica de un nuevo enfoque estadístico basado en metodología de árboles de decisión tipo CART (Classification and Regression Trees).

**Métodos:** Se realizó análisis mediante RL y CART para identificar modelos pronósticos de mortalidad a las 6 semanas en una cohorte prospectiva de 206 pacientes cirróticos con hemorragia aguda por varices esofágicas. La capacidad predictiva de los diferentes modelos se evaluó mediante comparación de curvas ROC.

**Resultados:** La mortalidad y recidiva a las 6 semanas fueron de 24 y 26%, respectivamente. Los factores independientes de morta-

lidad identificados mediante RL fueron: hepatocarcinoma (Odds ratio (OR): 6,6; intervalo de confianza 95% (IC): 2,0-21,5,  $p = 0,002$ ), varices grandes (OR: 3,1; IC: 1,2-7,8,  $p = 0,015$ ), hemorragia no controlada (OR: 9,2; IC: 1,9-45,9,  $p = 0,006$ ), infección (OR: 7,2; IC: 2,5-20,4,  $p < 0,001$ ), recidiva hemorrágica (OR: 4,0; IC: 1,5-10,5,  $p = 0,005$ ) y puntuación Child (OR: 1,5; IC 1,2-1,8,  $p < 0,001$ ). El análisis CART proporcionó un algoritmo sencillo, basado en la combinación de sólo 3 variables disponibles a la cabecera del paciente (puntuación Child, creatinina e infección), que permitía una discriminación precisa de 3 subgrupos pronósticos: uno de bajo riesgo (Child < 7), cuya mortalidad a las 6 semanas fue de 6%; un grupo de riesgo intermedio (Child > 7, creatinina basal < 1,35 mg/dL y que no presentaron infección bacteriana durante el ingreso), con una mortalidad de 17,5%; y un grupo de alto riesgo (Child > 7 con creatinina > 1,35 mg/dL o infección durante el ingreso) con mortalidad de 50-69%. Tanto los modelos basados en RL como en CART presentaron una excelente capacidad predictiva, con áreas bajo la curva ROC (ABC-ROC) que oscilaron entre 0,81-0,91, superiores a las obtenidas con la puntuación Child o MELD cuando se utilizaban de manera aislada (ABC-ROC 0,75 y 0,77, respectivamente).

**Conclusiones:** Un sencillo algoritmo, basado en análisis CART, que combina puntuación Child, creatinina e infección, permite una predicción precisa del riesgo de muerte a las 6 semanas de un episodio de hemorragia por varices esofágicas.

#### INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL Y DEL CRECIMIENTO TUMORAL MEDIANTE EL BLOQUEO DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT

J. Hu, A. Dong, V. Fernández-Ruiz, M. Kawa, D. Campos, C. Gomar, E. Martínez, B. Sangro, J. Prieto y C. Qian

División de Hepatología y Terapia Génica del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) y CIBERehd. Instituto Carlos III. Universidad de Navarra. Pamplona. España.

**Introducción y objetivos:** La activación anómala de la ruta de señalización de Wnt juega un papel importante en la progresión de muchos tumores. En el presente trabajo se ha explorado el efecto de antagonizar Wnt en la biología del hepatocarcinoma (HCC), un tumor con alta actividad angiogénica. Especialmente, hemos estudiado si la inhibición de la señalización Wnt, mediante la expresión exógena del factor de inhibición Wnt-1 (WIF1) y la proteína soluble asociada al receptor Frizzled (sFRP1), podría inhibir la angiogénesis tumoral y reducir el crecimiento tumoral.

**Métodos:** La versión humana de los antagonistas de Wnt, WIF1 y sFRP1 se clonaron y se fusionaron con la región Fc de IgG1 humana para construir una proteína de fusión WIF1-Fc y sFRP1-Fc. También se construyó un adenovirus codificador de WIF1-Fc y sFRP1-Fc bajo el control transcripcional de promotor CMV. Las proteínas de fusión recombinantes se purificaron con una columna de afinidad Hi-tap de proteína A.

**Resultados:** La infección de células HCC con los adenovirus Ad-WIF1-Fc y Ad-sFRP1-Fc se siguió de una correcta expresión y formación de las proteínas de fusión WIF1-Fc y sFRP1-Fc, las cuales provocaron apoptosis celular en varias líneas celulares de HCC. La inhibición de la señalización Wnt se confirmó por la disminución de la ciclina D, E2F1 y C-myc en células HCC tras su infección con los adenovirus terapéuticos. La actividad TCF, que se midió por TOP flash y FOP flash, disminuyó después del tratamiento con las proteínas de fusión recombinantes. El tratamiento de los HCC implantados en ratones inmunodeficientes produjo una inhibición significativa del tumor y prolongó la supervivencia de los animales. La inhibición del crecimiento tumoral se debió a la inducción de la apoptosis de las células tumorales y la supresión de la angiogénesis tumoral, ya que la densidad de la microvasculatura se redujo dra-

máticamente en los tumores tratados con los adenovirus Ad-WIF1-Fc y Ad-sFRP1-Fc. La expresión de los factores proangiogénicos VEGF y SDF-1 se halló igualmente disminuida. La formación de microtúbulos por las células endoteliales humanas (HMVECs) y por las células progenitoras endoteliales murinas (EPCs) disminuyó significativamente por el tratamiento con las proteínas de fusión. También se observó una disminución en la proliferación en las HMVECs e inducción de la apoptosis en EPCs en presencia de WIF1-Fc y sFRP1-Fc. Estas proteínas de fusión recombinantes inhibieron la diferenciación de las EPC producidas a partir de células mononucleares de médula ósea.

**Conclusión:** Nuestros resultados muestran que la expresión de los antagonistas de Wnt, WIF1-Fc y sFRP1-Fc inhiben la señalización de Wnt e disminuyen el crecimiento de HCC, provocando apoptosis de las células tumorales e inhibición de la angiogénesis del tumor.

#### LA DESCONTAMINACIÓN INTESTINAL SELECTIVA CON NORFLOXACINO RESTAURA LA FUNCIÓN NEUTROFÍLICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS CON ASCITIS

P. Zapater<sup>a,b</sup>, R. Caño<sup>a,c</sup>, R. Moreu<sup>b</sup>, L. Llanos<sup>b</sup>, A.J. Ruiz-Alcaraz<sup>d</sup>, S. Pascual<sup>a,c</sup>, C. Barqueró<sup>c</sup>, P. Bellot<sup>c</sup>, P. García-Peñarrubia<sup>d</sup>, J.F. Horga<sup>b</sup>, M. Pérez-Mateo<sup>c</sup>, J. Such<sup>a,c</sup> y R. Francés<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>CIBERehd. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

<sup>b</sup>Servicio de Farmacología Clínica. Alicante. España.

<sup>c</sup>Unidad Hepática. Hospital General Universitario. Alicante. España.

<sup>d</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B. Universidad de Murcia. Murcia. España.

**Introducción:** En los pacientes sometidos a descontaminación intestinal selectiva (DIS) con norfloxacino se observa una reducción en los niveles séricos de citocinas proinflamatorias. En el presente trabajo se estudia si estos cambios pueden explicarse, además de por una reducción del número de episodios de traslocación bacteriana (TB), por un efecto directo del norfloxacino modulando la capacidad fagocítica y la actividad inmune de estos pacientes.

**Material y métodos:** Se estudiaron 31 pacientes en DIS (norfloxacino oral 400 mg/día) para profilaxis secundaria de PBE. A los pacientes se les extrajo muestras de sangre 0,5-4 horas (muestra pico; N = 47) y 22-24 h tras la toma de la dosis de norfloxacino (muestra valle; N = 84). Se obtuvieron 59 muestras de LA. En 8 pacientes se administró una dosis de norfloxacino obteniendo muestras de sangre a los tiempos 0, 0,5, 1, 1,5, 2 y 4 horas. El estudio fue aprobado por el CEIC del Hospital de Alicante. Se determinaron las concentraciones séricas en LA e intracelulares de norfloxacino mediante cromatografía líquida (HPLC) y las concentraciones séricas y en LA de TNFalfa, INFgamma, IL-12 y óxido nítrico (NOx) mediante ELISA. Se cuantificó la señal NF-kappa B (Western blot), el estrés oxidativo de los neutrófilos en respuesta a PMA y la anexina V como marcador de apoptosis.

**Resultados:** No hubo diferencias significativas en las características clínicas y analíticas de los pacientes incluidos en los 3 grupos de muestras (pico, valle y perfil temporal). Ninguna de las muestras contenía DNA bacteriano ni LPS. Las concentraciones séricas y en LA de TNFalfa, INFgamma, IL-12 y NOx fueron significativamente menores en las muestras pico comparadas con las valle, existiendo una correlación significativa entre las concentraciones séricas de norfloxacino y TNFalfa ( $r = -0,68$ ;  $p < 0,001$ ), INFgamma ( $r = -0,66$ ;  $p < 0,001$ ), IL-12 ( $r = -0,66$ ;  $p < 0,001$ ) y NOx ( $r = -0,68$ ;  $p < 0,001$ ). Estas correlaciones se mantuvieron entre las concentraciones del fármaco y las citocinas y el NOx en LA. El máximo de concentraciones séricas de norfloxacino ( $1 \pm 0,5 \text{ ug/mL}$ ) se alcanzó entre 1 y 2 h tras la toma de la dosis, coincidiendo con el mínimo de concentraciones séricas de TNFalfa, INFgamma, IL-12 y NOx a las 2 h. Nor-

floxacino intracelular alcanza una acumulación máxima a las 2 h (2 ± 1 ug/mL/10<sup>6</sup> cels), lo que coincide con una reducción significativa de la señal de NF-kappa B, del estrés oxidativo de los neutrófilos en respuesta a PMA y de la cantidad de anexina V.

**Conclusión:** La acumulación de norfloxacino en los PMN de pacientes sometidos a DIS se asocia a una disminución del estrés oxidativo, de la señal de NF-kappa B y de los fenómenos de apoptosis, restaurando una función neutrofílica normal y haciendo fluctuar las concentraciones séricas y en LA de citocinas. Este efecto directo de norfloxacino debe tenerse en cuenta al estudiar la eficacia de la DIS y la baja frecuencia de aparición de resistencias en estos pacientes.

#### LA PROTEÍNA ACTIVADORA DE LA 5-LIPOOXYGENASA, FLAP, SEÑALIZA EL ESTADO DE INFLAMACIÓN CRÓNICO Y LA CAPACIDAD ESTEATOGÉNICA DEL TEJIDO ADIPOSO EN MODELOS EXPERIMENTALES DE OBESIDAD

R. Horrillo<sup>a</sup>, A. González-Périz<sup>a</sup>, M. Martínez-Clemente<sup>a</sup>, M. López-Parra<sup>a</sup>, N. Ferré<sup>a</sup>, E. Titos<sup>a</sup>, E. Moran-Salvador<sup>a</sup>, V. Arroyo<sup>b</sup> y J. Clària<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Universitat de Barcelona. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Unidad de Hígado. Hospital Clínic. CIBERehd, CIBERK, IDIBAPS. Universitat de Barcelona. Barcelona. España.

**Introducción:** Aunque durante mucho tiempo fue descrito como un mero depósito de energía, actualmente el tejido adiposo se considera como un órgano endocrino que participa en la regulación del balance energético del organismo. Estudios recientes indican que la disfunción del tejido adiposo contribuye de forma directa a la aparición de resistencia a la insulina y esteatosis hepática asociadas con la obesidad. En estas circunstancias, la disfunción del tejido adiposo se caracteriza por un estado inflamatorio crónico de bajo grado, que facilita la liberación de adiponquinas y de ácidos grasos libres (AGL) que inciden directamente en la infiltración de grasa en el hígado y en el desarrollo de daño hepático. Por tanto, la modulación del estado inflamatorio en el tejido adiposo representa una diana emergente en la prevención de la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática.

**Objetivo:** El objetivo del presente estudio fue investigar si la vía pro-inflamatoria de la 5-lipooxygenasa (5-LO) contribuye al desarrollo de inflamación en el tejido adiposo y si su inhibición es capaz de atenuar la disfunción y la capacidad esteatogénica de este tejido.

**Métodos:** En un primer estudio, se caracterizó la vía de la 5-LO en dos modelos de obesidad experimental: ratones C57/BL6 sometidos a una dieta rica en grasa (45% Kcal, 16 semanas) y ratones *ob/ob*. En un segundo estudio, ratones tratados con la dieta grasa recibieron placebo (n = 10) o el inhibidor de la proteína activadora de la 5-LO (FLAP), BAY-X-1005 (100 mg/kg, 4 semanas) (n = 10). Al final del estudio, se obtuvieron muestras de tejido adiposo y hepático para el análisis histológico y el análisis de la expresión de adiponquinas y genes del metabolismo lipídico. En un tercer estudio se evaluó el efecto de los leucotrienos (LTs), productos derivados de la 5-LO, en explantes de tejido adiposo y en adipocitos primarios.

**Resultados:** Los ratones obesos presentaron una mayor expresión de la FLAP, un aumento de los niveles de LTB<sub>4</sub> y un aumento de la actividad de la 5-LO en el tejido adiposo. El inhibidor BAY-X-1005 redujo de forma significativa la infiltración de macrófagos F4/80 positivos, la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNFα y IL-6 y la actividad de la HSL en el tejido adiposo. En este tejido, se observó también un aumento de la expresión de PPARα y de la fosforilación de AMPK, un factor clave en la sensibilidad a la insulina. Además, se observó que la inhibición de la 5-LO bloqueaba la secreción de AGL en explantes de tejido adiposo, y que el LTB<sub>4</sub> disminuía

la entrada de AGL en adipocitos primarios. Asociados con estos cambios en el tejido adiposo, BAY-X-1005 redujo significativamente los niveles séricos de AGL y el grado de esteatosis hepática, evaluada mediante tinción con Oil Red-O.

**Conclusión:** Estos resultados indican que la inhibición de la FLAP reduce el estado inflamatorio crónico de bajo grado y la capacidad esteatogénica del tejido adiposo en modelos experimentales de obesidad.

#### MODULACIÓN DE LA VÍA PD1/PD-L1 EN LA RESPUESTA CELULAR CITOTÓXICA MEDIADA POR LA PROTEÍNA DEL CORE DEL VHC

S. Benito<sup>a</sup>, J.R. Larrubia<sup>a,b</sup>, J. Miquel<sup>b</sup>, M. Calvino<sup>a</sup>, E. Sanz-de-Villalobos<sup>b</sup>, M.L. García-Buey<sup>c</sup>, F. González-Mateos<sup>b</sup>, A. González-Praetorius<sup>d</sup> y T. Parra<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Investigación. Hospital Universitario Guadalajara. Universidad de Alcalá. Madrid. España.

<sup>b</sup>Sección de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Guadalajara. Universidad de Alcalá. Madrid. España.

<sup>c</sup>Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario de La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

<sup>d</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Guadalajara. Universidad de Alcalá. Madrid. España.

**Introducción:** Ciertas proteínas virales pueden ejercer un efecto inmunomodulador sobre la respuesta celular citotóxica a través de la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras negativas. En este estudio se analizó el papel de la proteína del core del virus de la hepatitis C (VHC) en la modulación de la ruta PD1/PD-L1 en las células CD8(+).

**Material y métodos:** Se analizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 37 sujetos con infección por VHC y 12 controles sanos. La concentración de proteína del core del VHC fue estimada a partir de la carga viral (1 pg/mL de proteína del core equivale a 8.000 UI/mL de VHC-ARN). Las CMSP se tiñeron con anticuerpos marcados anti-CD8 y anti-PD1. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de PD-1 se correlacionó con la concentración de proteína del core. Se analizó la expresión de PD-1 en las células CD8(+) de controles sanos tras estimulación con anticuerpos anti-CD3/CD28 en presencia o ausencia de proteína del core o proteína B-gal. Mediante el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 se testó el efecto que producía sobre la proliferación celular la inducción de PD1 mediada por la proteína del core. En 3 pacientes HLA-A2(+) VHC(+) también se analizó el papel de la proteína del core en la modulación de PD-1 en las células VHC específicas y su efecto sobre la proliferación tras el encuentro antigeníco, de acuerdo con el bloqueo de la ruta PD-1/PD-L1. Las células CD8(+) VHC específicas se visualizaron tras marcaje con complejos HLA-A2/péptido y anticuerpos anti-CD8. La proliferación se analizó mediante la expresión de Ki67 en células CD8 totales y VHC específicas. Todos los marcajes se analizaron mediante citometría de flujo. Para el análisis estadístico se emplearon test no-paramétricos.

**Resultados:** Se observó una correlación positiva entre los niveles de proteína del core y la IMF de PD-1 (r = 0,501; p < 0,001). La estimulación específica y no específica del receptor de la célula T (RCT) en presencia de proteína del core aumentaba la expresión de PD1 en las células CD8(+) respecto a las incubadas con B-gal (p < 0,05). La sobreexpresión de PD-1 en las células CD8(+) totales y VHC específicas, inducida por la incubación con proteína del core, se tradujo en una alteración de la proliferación tras la estimulación del RCT (p < 0,01). Esta alteración desaparecía tras el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 mediante anticuerpos anti-PD-L1 (p < 0,05).

**Conclusiones:** En la hepatitis crónica C (HCC), la concentración de proteína del core del VHC se correlaciona con la expresión de

PD-1 en células CD8(+). La proteína del core aumenta la expresión de PD-1, previamente inducida por estimulación del RCT. Este mecanismo se correlaciona con una alteración de la proliferación que desaparece tras el bloqueo de la vía PD1/PD-L1. Todos estos datos sugieren que la proteína del core del VHC altera la función de las células CD8(+) en pacientes con HCC a través de la inducción de la ruta PD1/PD-L1.

#### TRATAMIENTO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA HEPATITIS C: RESULTADO FINAL DEL ESTUDIO TRIC-1

M. Romero-Gómez<sup>a</sup>, M. Diago<sup>b</sup>, R.J. Andrade<sup>b</sup>, J.L. Calleja<sup>b</sup>, J. Salmerón<sup>b</sup>, C.M. Fernández-Rodríguez<sup>b</sup>, R. Solà<sup>b</sup>, J.M. Herrerías<sup>b</sup>, J. García-Samaniego<sup>b</sup>, R. Moreno-Otero<sup>b</sup>, A. Olveira<sup>b</sup>, O. Núñez<sup>b</sup>, M de la Mata<sup>b</sup>, F. Jorquerá<sup>b</sup>, R.M. Morillas<sup>b</sup>, B. Dalmau<sup>b</sup>, R. Martín-Vivaldi<sup>b</sup>, J.I. Arenas-Ruiz<sup>b</sup>, E. Rodríguez<sup>b</sup>, S. Durán<sup>b</sup> y P. Giner<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Digestivas y CIBEREHD. Hospital Universitario de Valme. Sevilla. España.

<sup>b</sup>Grupo Español para el Tratamiento de la Resistencia a la Insulina en Hepatitis C.

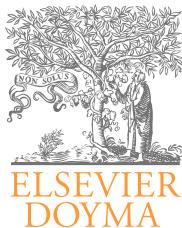
La resistencia a insulina afecta a la respuesta virológica sostenida (RVS) en pacientes con hepatitis C (Romero-Gómez et al. Gastro. 2005). Tratamos de determinar si la adición de metformina al régimen de tratamiento estándar (peginterferón + ribavirina) podría mejorar la RVS en pacientes con Hepatitis C genotipo 1 y resistencia a la insulina.

**Pacientes y métodos:** Estudio prospectivo, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo (TRIC-1), 125 pacientes consecutivos con hepatitis C genotipo 1 y resistencia a la insulina (HOMA > 2) recibieron 425 mg de metformina cada 8 horas durante el primer mes y 850 mg/8h desde la semana 4 a 48 (Brazo A; n = 59) o placebo (Brazo B; n = 64), añadido al tratamiento con peginterfe-

rón alfa-2a 180 microgramos semanales y 1000-1200 mg de ribavirina al día. El tratamiento se suspendió en pacientes sin respuesta viral temprana (RVT) o ARN-VHC positivo en la semana 24.

**Resultados:** No encontramos diferencias estadísticas basales entre los brazos A y B en las siguientes variables demográficas, bioquímicas y virológicas: edad ( $47 \pm 8$  vs  $48 \pm 8$  años); HOMA ( $4,3 \pm 2,2$  versus  $4,4 \pm 2,6$ ); índice de Sidney ( $0,43 \pm 0,27$  vs  $0,45 \pm 0,31$ ); la carga viral basal ( $6,33 \pm 0,73$  vs  $6,48 \pm 0,76 \log_{10}$  UI/ml). La respuesta virológica fue evaluada en la semana 4, 12, 24 y 72 mediante análisis por intención-de-tratar (ITT). En el análisis ITT se observó aclaramiento viral en el 54,2 vs 48,4% en la semana 12, en el 74,6 vs 75% en la semana 24, y en 52,5 vs 42,2% en la semana 72 (tasa de RVS) en el brazo A y el brazo B, respectivamente. En mujeres (n = 54), el aclaramiento viral fue mayor en el brazo de metformina en la semana 12 (57,7 vs 39,3%) en la semana 24 (80,8 vs 71,4%) y RVS (57,7 vs 28,6%, p = 0,031). Las mujeres que recibieron metformina presentaron un descenso de la viremia en las primeras 12 semanas significativamente mayor que las mujeres que recibieron placebo ( $-4,88 \pm 1,18$  vs  $-4,0 \pm 1,44$ ; p = 0,021). La RVS fue del 56,3% en las mujeres con un peso superior a 75 Kg. En el análisis por protocolo (n = 101) la tasa de RVS fue del 67,4% (31/46) en el brazo A frente al 49,1% (27/55) en el brazo B; p = 0,064. Los pacientes del brazo A mostraron una mayor disminución en su índice HOMA que los del brazo B ( $-1,6 \pm 2,14$  vs  $-0,87 \pm 2,11$ , p = 0,008). La triple terapia fue bien tolerada. Molestias gastrointestinales, principalmente diarrea, fueron más frecuentes en el brazo A (34,1 vs 11,4%; p < 0,05).

**Conclusiones:** La triple terapia con metformina, peginterferón alfa-2a y ribavirina es bien tolerada, disminuye la resistencia a insulina e incrementa la tasa de RVS. Esta terapia es especialmente eficaz en mujeres en las cuales la tasa de RVS se incrementa de forma significativa. Nuestros datos sugieren que esta triple terapia, por su seguridad y eficacia, debería utilizarse en el tratamiento de pacientes con hepatitis C genotipo 1 y resistencia a insulina. Agradecimientos: Subvencionado parcialmente por una beca de Roche-Farma, S.A.



## COMUNICACIONES ORALES

### XXXIV Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 25-27 de febrero de 2009

#### Sesión general 3

Moderadores: Jordi Muntané (Córdoba) y Pilar Barrera (Córdoba)

#### EL TRATAMIENTO CON CARDIOTROFINA-1 (CT-1) ACELERA LA REGENERACIÓN HEPÁTICA Y PRESERVA LA FUNCIÓN HEPATOCELULAR TRAS LA HEPATECTOMÍA MASIVA EN CERDOS

M. Íñiguez<sup>a,c</sup>, C. Montiel<sup>b</sup>, H. Chang<sup>a</sup>, M. Bustos<sup>a</sup>, F. Pardo<sup>b</sup>, F. Rotellar<sup>b</sup>, J. Ruiz<sup>c</sup>, V. Fernández<sup>c</sup>, J.I. Herrero<sup>b,d</sup>, B. Sangro<sup>b,d</sup>, J. Quiroga<sup>b,d</sup> y J. Prieto<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup>División de Hepatología y Terapia Génica del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Pamplona. España.

<sup>b</sup>Clinica Universitaria. Pamplona. España.

<sup>c</sup>Digna Biotech. Madrid. España.

<sup>d</sup>CIBERehd. Instituto Carlos III. Universidad de Navarra. España.

**Introducción:** La CT-1 es una citoquina perteneciente a la familia de la IL-6 con potentes propiedades hepatoprotectoras. En este trabajo se ha estudiado la influencia del tratamiento con CT-1 sobre la regeneración hepática y la función hepatocelular tras la realización de una hepatectomía masiva en cerdos.

**Métodos:** Se practicó una hepatectomía del 75-80% en minipigs de entre 50-70 kg. Los animales fueron divididos en dos grupos. Uno de los grupos recibió una dosis de CT-1 (400 µg/kg) mediante infusión intravenosa durante 30 min empezando 10 min antes de la intervención. Al segundo grupo se le administró suero salino en lugar de CT-1. Se tomaron muestras de sangre antes y después de la hepatectomía y cada 24 h. También se recogieron biopsias hepáticas antes de la operación, al término de la cirugía y en el sacrificio que se realizó a las 96 h poshepatectomía. Para valorar la eficacia de la CT-1 se midió el peso alcanzado por el hígado regenerado y se analizaron parámetros bioquímicos de función hepática en sangre. En las biopsias hepáticas se evaluaron parámetros de regeneración, como activación de STAT-3 y expresión de PCNA y ciclina D1 mediante western blot y PCR a tiempo real. Además, se determinaron mediante ELISA niveles de TNF-α, IL-6 e IGF-I.

**Resultados:** A los 4 días de la operación el peso del hígado de los animales tratados con CT-1 fue significativamente mayor al de los animales no tratados (ratio peso hígado-peso animal fue de 0,91% en el grupo no tratado y de 1,32 en el grupo tratado). Asimismo, los animales tratados presentaban un menor incremento de bilirrubina,

na, fosfatasa alcalina y ALT que el observado en el grupo no tratado. Esta mejoría bioquímica resultó también acompañada de menor daño histopatológico en las biopsias obtenidas en el sacrificio y de una mayor activación hepática de STAT-3 al final de la hepatectomía. En ese momento los niveles de TNF-α séricos fueron mayores en los animales que recibieron CT-1 que en los no tratados, sin embargo la concentración de IL-6 fue similar en ambos grupos. Además, mientras que tras la intervención los niveles de IGF-I experimentaron una marcada reducción en los animales no tratados, la concentración de este factor de crecimiento no disminuyó por efecto de la hepatectomía en aquellos animales que recibieron CT-1, que permanecieron significativamente superiores al del grupo control durante los 2 días siguientes a la hepatectomía.

**Conclusiones:** La administración de CT-1 mejora la función hepática tras la resección hepática y adelanta la regeneración. Este efecto se asocia a la activación de STAT-3 en el hígado remanente y a la inducción de moléculas proregenerativas como TNF-α e IGF-I. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el tratamiento con CT-1 podría reducir el riesgo de fallo hepático fulminante postoperatorio tras una resección hepática extensa, como las que se practicarían en el contexto de la cirugía de cáncer hepático o en el trasplante hepático de donante vivo.

#### EL USO PRECOZ DE TIPS CON PRÓTESIS RECUBIERTAS EN LA HEMORRAGIA POR VARICES EN PACIENTES CIRRÓTICOS CON ALTO RIESGO DISMINUYE EL FRACASO TERAPÉUTICO Y LA MORTALIDAD PRECOZ Y A LARGO PLAZO. ESTUDIO MULTICÉNTRICO ALEATORIZADO

J.C. García-Pagán<sup>a</sup>, K. Caca<sup>b</sup>, C. Bureau<sup>c</sup>, W. Laleman<sup>d</sup>, B. Appenrodt<sup>e</sup>, A. Luca<sup>f</sup>, F. Nevens<sup>d</sup>, J.P. Vinel<sup>c</sup>, I. Schieffke<sup>g</sup> y J. Bosch<sup>a</sup>; por el Variceal Bleeding Cooperative Study Group

<sup>a</sup>Hepatic Hemodynamic lab. Liver Unit. Hospital Clínic. IDIBAPS y Ciberehd. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Med. Clinic I. Hospital Ludwigshburg. Germany.

<sup>c</sup>Hôpital Pourpan. Toulouse. France.

<sup>d</sup>Leuven. Belgium.

<sup>e</sup>Bonn. Germany.

<sup>f</sup>Ismet. Palermo. Italia.

<sup>g</sup>Med. Clinic II. Uni. Hospital Leipzig. Germany.

A pesar del tratamiento recomendado de la hemorragia por varices (HAV), con fármacos vasoactivos, ligadura endoscópica y antibióticos, existe un grupo de pacientes con alto riesgo de fracaso

terapéutico y con elevada mortalidad a pesar de la utilización del TIPS como técnica de rescate. Estos se pueden identificar por un HVPG > 20 mmHg, o más recientemente por un Child-Pugh score > 10 o > 8 si coexiste hemorragia activa en la endoscopia (con tratamiento vasoactivo). El objetivo del presente estudio fue evaluar si, en estos pacientes, el uso precoz de TIPS con prótesis recubiertas de politetrafluoroetileno (TIPS-PTFE), podría disminuir el riesgo de fracaso terapéutico y la mortalidad a corto y largo plazo.

En 9 centros europeos, 63 pacientes cirróticos de alto riesgo con HAV tratados con fármacos vasoactivos + tratamiento endoscópico + antibióticos se aleatorizaron (dentro de las primeras 24 h tras su ingreso) a: 1) continuar con fármacos vasoactivos (iniciándose al 3-5 día la administración de nadolol/propranolol ± mononitrato) + sesiones de ligadura para lograr la erradicación, utilizando el TIPS como tratamiento de rescate (grupo fármacos+ligadura ( $n = 31$ ), o 2) realizar un TIPS-PTFE precoz, siempre dentro de las primeras 72 h (grupo TIPS-PTFE;  $n = 32$ ). Los objetivos primarios analizados fueron: 1) fracaso en el control de la hemorragia o recidiva y 2) la supervivencia.

No existieron diferencias significativas entre los 2 grupos en edad, sexo, etiología, clase de Child y gravedad del episodio hemorrágico. El seguimiento medio fue de 16 meses. Presentaron fracaso o recidiva 14 pacientes del grupo fármacos+ligadura vs. 1 en el TIPS-PTFE ( $P < 0,01$ ). La probabilidad actuarial anual de permanecer libre de fracaso/recidiva fue de un 50 vs 97%; ( $p < 0,001$ ). 7 pacientes del grupo fármacos+ligadura recibieron TIPS-PTFE como tratamiento de rescate. Cuatro pacientes adicionales presentaron recidivas no significativas (3 en el grupo fármacos+ligadura vs. 1 en el TIPS-PTFE). Diecisésis pacientes fallecieron (12 en el grupo fármacos+ligadura vs 4 en el TIPS-PTFE; ( $p < 0,02$ ). La supervivencia actuarial a las 6 semanas y al año fue del 67 y del 60% en el grupo fármacos+ligadura vs 96 y 86% en el TIPS-PTFE ( $p < 0,01$ ). La probabilidad anual de presentar ascitis «de novo» o empeoramiento de la ascitis fue del 33% en el grupo fármacos+ligadura vs 13% en el TIPS-PTFE ( $p = 0,11$ ), y de desarrollar encefalopatía del 40 vs 28% (NS).

**Conclusión:** En pacientes cirróticos con HAV y alto riesgo de fracaso terapéutico, el tratamiento precoz con TIPS-PTFE se asocia a una marcada y significativa reducción en el riesgo de fracaso terapéutico, recidiva hemorrágica y en la mortalidad a corto y largo plazo en comparación al tratamiento estándar. Por ello, en estos pacientes, el TIPS-PTFE debería ser el tratamiento de elección.

Clinical trial registration: ISRCTN58150114

#### EXPRESIÓN DE CD81 DURANTE EL TRATAMIENTO CON INTERFERÓN-ALFA2A PEGILADO Y RIBAVIRINA EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

B. Soldevila<sup>a</sup>, N. Alonso<sup>a</sup>, M.J. Martínez-Arconada<sup>b</sup>, R.M. Morillas<sup>c</sup>, A. Sanmartí<sup>a</sup>, R. Planas<sup>c</sup> y E.M. Martínez-Cáceres<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. España.

<sup>b</sup>Servicio de Inmunología. LIRAD-BST. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. España.

<sup>c</sup>Servicio de Aparato Digestivo. CIBERehd. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. España.

**Introducción:** Se ha descrito la tetraspanina CD81 como uno de los receptores del virus de la hepatitis C (VHC) en los linfocitos B (LB). Los estudios realizados en pacientes con VHC tratados con interferón-alfa2a pegilado (pegIFN $\alpha$ 2a) y ribavirina (RBV) muestran una expresión disminuida de CD81 en LB en pacientes con respuesta virológica sostenida (RVS) respecto a los no respondedores (NR) al finalizar el tratamiento (TT).

**Objetivos:** Valorar la expresión de CD81 en los LB en sangre periférica (SP) de pacientes con infección crónica por VHC (CHC) du-

rante el TT con pegIFN $\alpha$ 2a y RBV y evaluar si existen diferencias en su expresión entre los pacientes con RVS y los NR.

**Material y métodos:** Se estudian 28 pacientes con CHC tratados con pegIFN $\alpha$ 2a y RBV. Antes del inicio del TT, a la mitad, al finalizarlo y a los seis meses de su finalización, se les realiza una extracción sanguínea, con criopreservación de las células mononucleares en SP (PBMC). La expresión de CD81 en LB se estudia mediante la media de inmunofluorescencia (MIF) y se analiza por citometría de flujo (anticuerpos anti-CD19 y anti-CD81).

**Resultados:** Al analizar todos los pacientes, se observa un incremento significativo de la expresión de CD81 en los LBCD19+ a lo largo del TT. Este incremento se observa al comparar el tiempo basal con el de finalización de TT ( $54,22 \pm 31,66$  vs  $45,49 \pm 23$ ;  $p = 0,036$ ) y el basal con el de 6 meses después de finalizar el TT ( $63,18 \pm 30,97$  vs  $45,49 \pm 23,46$ ;  $p = 0,02$ ). Esta misma tendencia, aunque no significativa, se observa tanto en el grupo de pacientes con RVS ( $n = 16$ ) como en el de los NR ( $n = 12$ ). Sin embargo, los pacientes con RVS muestran, en comparación con los NR, una expresión de CD81 en LBCD19+ significativamente menor en todos los tiempos evaluados: antes del inicio del TT ( $32,66 \pm 2,24$  vs  $62,97 \pm 26,62$ ;  $p = 0,003$ ), a la mitad ( $35,77 \pm 15,10$  vs  $83,56 \pm 38,31$ ;  $p = 0,002$ ), al finalizarlo ( $43,56 \pm 17,25$  vs  $79,82 \pm 45,09$ ;  $p = 0,027$ ) y a los 6 meses de su finalización ( $48,81 \pm 20,04$  vs  $80,79 \pm 35,54$ ;  $p = 0,036$ ).

**Conclusiones:** Los pacientes con CHC de nuestro estudio presentan un incremento en la expresión de CD81 en LB en SP durante el TT y éste se mantiene a los seis meses de su finalización. Así mismo, la expresión de CD81 en LB varía en función de la respuesta virológica al TT, siendo menor en los pacientes con RVS que en los NR. Esta diferencia ya se observa antes de iniciar el tratamiento. Estos resultados sugieren que la expresión de CD81 en los LB podría estar implicada en la respuesta al tratamiento de estos pacientes, siendo un posible marcador pronóstico. Se tendrán que realizar futuros estudios al respecto.

#### FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON CIRROSIS Y SÍNDROME HEPATORRENAL TRATADOS CON TERLIPRESINA Y ALBÚMINA

A. Nazar<sup>a,b,c</sup>, M. Guevara<sup>a,b,c</sup>, M. Marinelli<sup>a,b,c</sup>, M. Martín-Llahí<sup>a,b,c</sup>, M.N. Pepín<sup>a</sup>, M.E. Baccaro<sup>a,b,c</sup>, E. Urtasun-Sotil<sup>a,b,c</sup>, E. Solà<sup>a,b,c</sup>, V. Arroyo<sup>a,b,c</sup> y P. Ginès<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Hepatología. Hospital Clínic. Universitat de Barcelona. Barcelona. España.

<sup>b</sup>IDIBAPS.

<sup>c</sup>CIBERehd. Ciber de Enfermedades Hepáticas y Digestivas.

Se ha demostrado que la administración de terlipresina y albúmina mejora la función renal en los pacientes con síndrome hepatorrenal (SHR). Sin embargo, un 40-60% de los pacientes no responden a esta medida terapéutica. La investigación de factores predictivos de respuesta al tratamiento en pacientes con SHR es importante para mejorar su eficacia y establecer nuevas modalidades terapéuticas para los pacientes no-respondedores. El objetivo de este estudio fue identificar factores predictivos de respuesta en los pacientes con SHR tratados con terlipresina y albúmina. Cincuenta y un pacientes consecutivos con cirrosis y SHR (39 tipo1 y 12 tipo 2) fueron tratados de forma prospectiva con terlipresina y albúmina. Se analizó el valor predictivo de las variables demográficas, clínicas y analíticas obtenidas antes del comienzo del tratamiento. La respuesta al tratamiento fue definida como una reducción en los niveles de creatinina sérica por debajo de 1,5 mg/dL durante el tratamiento (completa) o como la reducción de los niveles de creatinina sérica > 50% con un valor final > 1,5 mg/dL (parcial). No se trataron los pacientes con infección bacteriana activa. Veintisiete pacientes (53%) presentaron respuesta al tratamiento (completa en 25 y parcial en 2). En el análisis univariado la bilirrubina sérica, los leucocitos séricos, las transaminasas, el volu-

men urinario y la puntuación de MELD se asociaron de forma significativa con la respuesta al tratamiento. En el análisis multivariado los únicos factores predictivos independientes de respuesta fueron los niveles de bilirrubina sérica y el recuento de leucocitos. Ni la creatinina sérica ni el MELD tuvieron valor predictivo independiente de respuesta al tratamiento. Los niveles medios de bilirrubina sérica (media  $\pm$  DS) en los respondedores vs los no-respondedores fueron  $6 \pm 1$  y  $25 \pm 4$  mg/dL, respectivamente. Los valores del recuento de leucocitos fueron  $6.880 \pm 574$  y  $10.425 \pm 1.067/\text{mm}^3$ , respectivamente. El valor de corte de bilirrubina sérica que mejor predijo la respuesta al tratamiento fue 10 mg/dL (AUC: 0,79,  $p < 0,001$ , sensibilidad = 93% y especificidad = 63%), mientras que para el recuento de leucocitos fue  $9.500/\text{mm}^3$  (AUC: 0,71,  $p < 0,011$ , sensibilidad = 82% y especificidad = 54%). La tasa de respuesta en los pacientes con bilirrubina  $< 10$  mg/dL y con recuento de leucocitos  $< 9.500/\text{mm}^3$  fue de 80% (20 de 25 pacientes), comparada con 0% en los pacientes con bilirrubina  $\geq 10$  mg/dL y con leucocitos  $\geq 9.500/\text{mm}^3$  (9 de 9 pacientes). En pacientes con SHR los niveles de bilirrubina sérica y el recuento de leucocitos predicen la respuesta al tratamiento con terlipresina y albúmina. Esto sugiere una disminución del efecto vasoconstrictor de la terlipresina en pacientes con insuficiencia hepática grave y respuesta inflamatoria sistémica. Deberían investigarse estrategias alternativas al tratamiento con terlipresina y albúmina para los pacientes con SHR y bajas probabilidades de respuesta al tratamiento vasoconstrictor.

## FIRMA GENÉTICA PREDICE INVASIÓN VASCULAR EN CARCINOMA HEPATOCELULAR

B. Mínguez<sup>a</sup>, Y. Hoshida<sup>b</sup>, A. Villanueva<sup>d</sup>, L. Cabellos<sup>a</sup>, S. Toffanin<sup>a</sup>, S. Roayaie<sup>a</sup>, M. Schwartz<sup>a</sup>, S. Thung<sup>a</sup>, V. Mazzaferro<sup>c</sup>, J. Bruix<sup>d</sup>, S. Friedman<sup>a</sup>, T.R. Golub<sup>b</sup> y J.M Llovet<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Mount Sinai Liver Cancer Program. Division of Liver Diseases. Mount Sinai School of Medicine. New York. USA.

<sup>b</sup>Cancer Program. Broad Institute. Cambridge. USA.

<sup>c</sup>National Cancer Institute. Milan. Italia.

<sup>d</sup>Barcelona Clinic Liver Cancer Group. Liver Unit. Hospital Clinic. CIBERehd. IDIBAPS. Barcelona. España.

**Antecedentes:** La presencia de invasión vascular es el factor predictivo más importante de recidiva tras resección quirúrgica y trasplante hepático en el carcinoma hepatocelular (CHC). Es necesario identificar nuevas herramientas moleculares que permitan evaluar con precisión la presencia de invasión vascular para optimizar la selección de pacientes para tratamientos quirúrgicos y la estratificación de pacientes con CHC en ensayos clínicos.

**Objetivos:** 1) Identificar una firma genética de invasión vascular en pacientes con CHC y 2) establecer un modelo predictivo basado en datos moleculares y clínicos capaz de identificar la presencia de invasión vascular.

**Métodos:** Se evaluó el perfil genético de 79 muestras de tejido fresco congelado procedente de resecciones de pacientes con CHC (BCLC 0-A: 85%, Child-Pugh: A 97%) e infección por hepatitis C usando Affymetrix U133 plus 2.0 arrayp. Los genes disregulados en la invasión vascular se identificaron por análisis supervisado, y se identificaron los significativamente alterados por regresión logística. Para validación de la firma se estudió el perfil genético de 153 muestras de tejido parafinado procedente de resecciones de CHC de pacientes de diferentes etiologías usando Illuminap (*whole-genome DASL microarray*). Los genes candidatos se evaluaron con RT-PCR cuantitativa con Taqman Gene Expression Assaysp en 80 CHC, 10 cirróticos y 8 controles. Las asociaciones entre genes candidatos y evolución (supervivencia y recurrencia) se analizaron con Kaplan-Meier y log-rank. Mediante regresión logística se identificaron las variables clínicas, histológicas y moleculares con capacidad predictiva independiente de invasión vascular.

**Resultados:** Identificamos una firma genética compuesta por 40 genes (16 sobreexpresados y 24 infraexpresados) capaz de discriminar pacientes en función de la presencia de invasión vascular, con una precisión del 72%. El análisis multivariado mostró que la firma genética y el tamaño  $> 3$  cm son factores con capacidad predictiva independiente de invasión vascular (OR 7,5 y 3,9, respectivamente). CD24 fue el gen más sobreexpresado ( $\times 3,9$  veces,  $p < 0,001$ ). Los niveles de mRNA de CD24 estaban significativamente aumentados en CHC en comparación con controles ( $\times 5,8$  veces,  $p = 0,02$ ), especialmente en pacientes con invasión vascular macroscópica ( $\times 13,4$  veces,  $p = 0,009$ ). La firma genética se validó en la cohorte independiente de 153 muestras. La combinación de firma genética y tamaño tumoral presentó la máxima eficacia diagnóstica de invasión vascular.

**Conclusiones:** Se ha identificado una firma genética predictiva de invasión vascular en carcinoma hepatocelular. La combinación de esta firma y el tamaño tumoral ( $> 3$  cm) discriminan pacientes con CHC en función de la presencia de invasión vascular con una precisión que alcanza el 70-80%. Este hallazgo tiene implicaciones clínicas en el manejo terapéutico de pacientes con CHC.

## IMPORTANCIA DEL ALELO HLA-DQB1\*0301 COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA VIROLÓGICA MANTENIDA (RVM) EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA C (HCC), GENOTIPO 1, TRATADOS CON INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA

P. Muñoz de Rueda<sup>a</sup>, M.A. López-Nevot<sup>b</sup>, J. Casado<sup>a</sup>, A. Martín-Casares<sup>b</sup>, L. Rodríguez<sup>a</sup>, R. Quiles<sup>a</sup>, M. Romero-Gómez<sup>c</sup>, M. Diago<sup>d</sup>, A. Martín<sup>a</sup>, J.A. Muñoz<sup>a</sup>, A. Ruiz-Extremera<sup>a</sup> y J. Salmerón<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Aparato Digestivo y de Pediatría. Hospital Universitario San Cecilio. Granada. CIBEREHD. España.

<sup>b</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

<sup>c</sup>Unidad de Hepatología. Hospital Nuestra Sra. de Valme. Sevilla. CIBEREHD. España.

<sup>d</sup>Unidad de Hepatología. Hospital General de Valencia. Valencia. España.

**Antecedentes y objetivo:** Es conocida la importancia que tienen los genes HLA en la respuesta inmune antiviral. Por este motivo, se pretende evaluar la influencia que tienen los factores genéticos del hospedador sobre la respuesta virológica en pacientes con HCC tratados con interferón pegilado (IFNpeg) y ribavirina (RBV).

**Sujetos de estudio:** Se han estudiado 282 pacientes con HCC, españoles de raza blanca, tratados con IFNpeg y RBV ( $n = 256$ , 91%) o con IFN estándar y RBV ( $n = 26$ , 9%). 117 (41%) eran menores de 40 años, 147 (52%) eran hombres y 189/263 (72) tenían una carga viral  $> 600.000$  UI/ml. Según el tipo de respuesta al tratamiento se han dividido en dos grupos: 1) pacientes con RVM ( $n = 153$ , 54%) y 2) pacientes sin RVM (no-RVM,  $n = 120$ , 43%).

**Métodos y resultados:** Se ha realizado un tipaje genómico de HLA mediante los métodos PCR-SSO (Sequence-specific oligopropes) (One Lambda, Inc.) y secuenciación de los distintos loci con SBT (Sequence-based typing). Se han genotipado los genes HLA de clase I (A, B y C), y los de clase II (DRB1 y DQB1) en los 282 pacientes. El análisis bivariante indica que los pacientes menores de 40 años ( $p = 0,0001$ ), la carga viral  $< 600.000$  UI/ml ( $p = 0,0001$ ), menor fibrosis ( $p = 0,05$ ), menor AST ( $p = 0,016$ ), menor GGT ( $p = 0,003$ ) y la presencia del alelo HLA-DQB1\*0301 ( $p = 0,002$ ,  $p$  corregida por Bonferroni = 0,03) son factores predictivos de RVM. En el análisis multivariante, son factores independientes de RVM la edad (OR: 0,36;  $p = 0,001$ , IC 95%: 0,2-0,66), la carga viral (OR: 0,44;  $p = 0,024$ , IC 95%: 0,22-0,9), GGT (OR: 1,009;  $p = 0,007$ , IC 95%: 1,002-1,015), haciendo especial hincapié en el alelo HLA-

DRQB1\*0301 como marcador genético independiente del resto de variables (OR: 0,45;  $p = 0,036$ , IC 95%: 0,22-0,94). Al hacer el estudio en los pacientes que fueron tratados con IFNpeg (91%) se obtuvieron los mismos resultados; sin embargo, no había diferencias significativas con el IFN estándar ( $n = 26$ ) por el número tan escaso de pacientes. Otro dato relevante fue que el 77% de los pacientes que no presentaban el alelo HLA-DQB1\*0301 tenían una carga viral  $> 600.000$  UI/ml, mientras que aquellos que presentaban este alelo, el 50% tenían alta carga viral ( $p = 0,0001$ ). Al hacer un análisis estratificado entre hombres y mujeres, encontramos que el 100% de los hombres que presentaron el alelo HLA-Cw\*14 de clase I ( $n = 6$ ) no respondieron al tratamiento ( $p = 0,002$ ,  $P$  corregida por Bonferroni = 0,025).

**Conclusiones:** El HLA es un factor predictivo de respuesta al tratamiento. El alelo HLA-DQB1\*0301 predice la RVM; en cambio, en los hombres, el alelo HLA de clase I Cw\*14 predice la no respuesta al tratamiento.

#### MUTACIONES INMUNODOMINANTES DE LA REGIÓN DEL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B: EFECTO DE LAS TERAPIAS ANTIVIRALES EN LA EVOLUCIÓN VIRAL

M. Homs<sup>a</sup>, M. Schaper<sup>a,b</sup>, D. Tabernero<sup>a</sup>, R. Jardí<sup>a,b</sup>, M. Buti<sup>a,c</sup>, F. Rodríguez-Frías<sup>a,c</sup> y R. Esteban<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>CIBERehd. Instituto de Investigación. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

<sup>c</sup>Departamento de Hepatología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

**Introducción y objetivos:** La región del core del VHB codifica la cápside viral (HBc). Los anticuerpos anti-HBc están presentes en todas las infecciones por VHB, lo que sugiere que la proteína core puede ser la diana principal de la respuesta inmunológica. Los cambios de los aminoácidos (AA) en los epítopos del HBc, expresados en hepatocitos infectados, podrían conferir al virus un mecanismo de escape del sistema inmunológico.

El objetivo principal del estudio ha sido evaluar la frecuencia de substituciones aminoacídicas en epítopos principales y en AA de las regiones más conservadas del HBc, en pacientes con hepatitis crónica B no tratados (NT) y en tratamiento con interferón (IFN), lamivudina (LVD) o adefovir (ADV).

**Métodos:** En el estudio se incluyeron 75 pacientes crónicos (tabla 1), las muestras se clasificaron según el grupo de tratamiento. En el grupo basal, se analizaron secuencias de muestras que posteriormente fueron tanto tratadas como NT.

Los cambios de los AA fueron analizados en las principales regiones inmunoestimuladoras de los epítopos de los linfocitos T colaboradores (Th) (AA 50 al 69) y de los B (AA 74 al 84) y dos regiones más conservadas (AA 1 al 11 y AA 28 al 47).

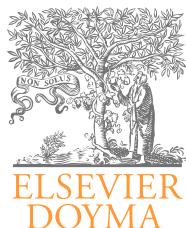
**Resultados:** Se calcularon el número (promedio) de AA cambiados (tabla 1) en cada tratamiento y se compararon entre ellos. Se observaron diferencias significativas en las regiones de los AA 50 al 69 y del 74 al 84 de pacientes tratados con IFN, respecto a los otros grupos de tratamiento (LVD, ADV y NT) ( $p < 0,001$ ). No se detectaron diferencias entre genotipos A y D. Las variantes mutadas del pre-core (PC) en las muestras basales concentraban un mayor número de cambios de AA en la región 74-84, respecto a las no mutadas, sugiriendo que las mutadas están sometidas a una mayor presión inmunológica por la falta del HBeAg, causada por el codón Stop de la mutante del PC.

**Discusión:** Los resultados evidenciaron que el tratamiento con IFN está implicado en incrementar significativamente la presión sobre los epítopos de las células Th y B, en relación con los NT o las terapias con inhibidores de la polimerasa. Estos resultados concuerdan con el papel inmunoestimulante del IFN. El análisis de los casos no tratados demuestra la tendencia del virus a seleccionar variantes de la quasispecie con cambios situados principalmente en epítopos de las células Th y B y preservando las regiones más conservadas del gen core. Esto indica que, aunque no haya presión farmacológica, el virus está continuamente mutando para escapar de la presión inmunológica.

Este proyecto ha sido financiado por el Instituto Carlos III (FIS-PI061512).

TABLA 1 Cambios AA por grupo de TTO

Región Core	NT	IFN	LVD	ADV
50-69	0,89	4,35	0,60	0,97
74-84	0,78	3,17	0,98	1,05
28-47	0,33	1,29	0,50	1,18
1-11	0	0,24	0,33	0,66



## COMUNICACIONES ORALES

### XXXIV Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 25-27 de febrero de 2009

#### Sesión general 4

*Moderadores: Bruno Sangro (Pamplona) y Rosa María Morillas (Barcelona)*

#### DETECCIÓN DE MUTANTES DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE LA REGIÓN PROTEASA NS3 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) EN PACIENTES CRÓNICOS NO TRATADOS MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN

M. Cubero<sup>a,b,c</sup>, J. Ignacio Esteban<sup>a,b,c</sup>, S. Sauleda<sup>c,d</sup>, M. Bes<sup>c,d</sup>, I. Ortega<sup>e</sup>, J.L. Mosquera<sup>e</sup>, A. Sánchez<sup>e</sup>, R. Esteban<sup>a,b,c</sup>, J. Guardia<sup>a,b,c</sup> y J. Quer<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Hepatología. Medicina Interna. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Universitat Autònoma de Barcelona. UAB. Bellaterra. Barcelona. España.

<sup>c</sup>CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) del Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

<sup>d</sup>Banc de Sang i de Teixits. Institut Català de la Salut. Barcelona. España.

<sup>e</sup>Unidad Estadística y Bioinformática. IR. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

**Antecedentes:** La presencia de virus resistentes a los inhibidores selectivos de la proteasa NS3 y NS5B del VHC representa uno de los mayores problemas en el tratamiento de esta enfermedad. Estos mutantes resistentes representan una población minoritaria en las cuasiespecies, dificultando su detección mediante las herramientas clásicas (clonación-secuenciación). La detección de variantes minoritarias con interés clínico a partir de una población compleja sería un gran hito científico que permitiría abordar estrategias de personalización de las terapias antivirales en pacientes con infección crónica por VHC, con el fin de mejorar la eficacia de éstos. Actualmente, la Plataforma de Secuenciación por Pirosecuenciación FLX permite la amplificación y secuenciación masiva en paralelo de moléculas de ADN individual.

**Objetivos:** Estudio de la presencia de mutantes resistentes a inhibidores de la proteasa NS3 en pacientes crónicos que no han sido tratados previamente con estos agentes antivirales mediante la tecnología 454-FLX y comparar los resultados con el método clásico de clonación-secuenciación.

**Métodos:** A partir de RT-PCR de NS3 de 3 muestras de un paciente crónico genotipo 1a (biopsias 1998 y 2006 y plasma 2006-estudio

longitudinal) y una biopsia de un paciente genotipo 1b se obtuvieron unas 250.000 secuencias mediante 454-FLX. En colaboración con un grupo de bioinformática de la Unidad Científica Técnica de Soporte del Institut de Recerca se han establecido los criterios para crear un protocolo de análisis automatizado. También se efectuó una RT-PCR y clonación-secuenciación mediante el método clásico de Sanger de las 2 biopsias del mismo paciente genotipo 1a y se obtuvieron 97 y 128 clones, respectivamente.

**Resultados:** De las 250.000 secuencias de 250 bases obtenidas por pirosecuenciación se obtuvieron porcentajes de secuencias máster y otras secuencias mayoritarias que fueron similares a las obtenidas por el método clásico (97 y 128 clones). Sin embargo, con respecto, a la detección de mutantes de resistencia minoritarios, por el método clásico tan sólo fuimos capaces de detectar una mutación de resistencia en 128 clones (Cubero et al, Virology. 2008), mientras que por pirosecuenciación hemos detectado la presencia en diferentes proporciones de la mayoría de las mutaciones de resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 descritas en la literatura con el uso de replicones.

**Conclusiones:** La ultrasecuenciación por pirosecuenciación presenta un enorme potencial para detectar mutantes minoritarios. El análisis en profundidad de la población viral en pacientes con infección crónica por VHC permitiría la posibilidad de diseñar y establecer estrategias de personalización de terapias dirigidas a dichos pacientes.

#### EFFECTOS DE LAS PROTEÍNAS DE LA DIETA EN LA EVOLUCIÓN DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

I. Les<sup>a</sup>, M. Planas<sup>a</sup>, M. Flavià<sup>a</sup>, G. Cárdenas<sup>a</sup>, P. Gómez<sup>a</sup>, M. Vergara<sup>b</sup>, G. Soriano<sup>c</sup>, C. Vila<sup>d</sup> y J. Córdoba<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Corporación Sanitaria Parc Taulí. Barcelona. España.

<sup>c</sup>Hospital de Sant Pau. Barcelona. España.

<sup>d</sup>Hospital del Mar. Barcelona. España.

**Introducción:** Es muy frecuente que los pacientes con cirrosis hepática y antecedente de encefalopatía hepática (EH) reciban una dieta baja en proteínas. Sin embargo, la eficacia de esta medida terapéutica no ha sido evaluada en un ensayo clínico. Por otro lado, existen evidencias de que suplementar la dieta con aminoácidos de cadena ramificada (AAR) puede mejorar la función hepática y disminuir la encefalopatía hepática.

**Objetivo:** Evaluar los efectos sobre la recidiva de la EH de una dieta normoproteica suplementada con AAR respecto a una dieta

hipoproteica en pacientes con cirrosis hepática no terminal (MELD  $\leq 25$ ) que han presentado un episodio previo de encefalopatía hepática.

**Métodos:** Estudio multicéntrico y doble ciego de 56 semanas de duración, que incluye 121 pacientes que se asignaron de forma aleatoria a recibir una dieta individualizada baja en proteínas (0,7 g/kg peso/día) suplementada con sobres isocalóricos de 30 g de: a) AAR (dieta normoproteica, n = 59); b) hidratos de carbono (dieta hipoproteica, n = 62). Se realizó un cálculo muestral asumiendo una disminución relativa de la EH del 50%. Un dietista diseñó las dietas personalizadas y comprobó su cumplimiento. Se realizaron controles clínicos, neuropsicológicos y de calidad de vida cada 8 semanas. El estudio se inició en 2003 y la inclusión finalizó en enero de 2008. Se dispondrá de los resultados definitivos en febrero de 2009.

**Resultados:** El seguimiento medio fue  $30,6 \pm 21,6$  semanas (grupo A:  $28,5 \pm 21,1$  vs. grupo B:  $32,7 \pm 22,2$ , p = 0,321). Ocho pacientes murieron en el grupo A y 11 en el B (HR = 1,02; IC 95% 0,39-2,65; p = 0,967). Se realizó trasplante hepático en 16 pacientes del grupo A y en 11 del B (HR = 0,62; IC 95% 0,29-1,34; p = 0,23). Se produjo recidiva de la encefalopatía hepática en 18 (34%) pacientes del grupo A y en 27 (49%) del B (p = 0,111). El número total de días con encefalopatía hepática fueron  $2,5 \pm 5,4$  para el grupo A y  $4,8 \pm 7,6$  para el B (p = 0,082). Seis pacientes del grupo A (11%) y 4 (7%) del B desarrollaron encefalopatía hepática crónica (p = 0,468). Los días de hospitalización fueron  $10 \pm 20,3$  para el grupo A vs.  $7,2 \pm 11,2$  para el B (p = 0,376).

**Conclusiones:** En pacientes con cirrosis hepática y antecedente de encefalopatía hepática la administración de una dieta normoproteica suplementada con aminoácidos de cadena ramificada muestra una tendencia a ser más eficaz que la dieta hipoproteica en prevenir la recidiva de la encefalopatía hepática. Estos resultados están de acuerdo con la recomendación de no disminuir el aporte de proteínas en la dieta de los pacientes que han presentado encefalopatía hepática.

#### EL TNF ALFA INDUCE RESISTENCIA AL INTERFERÓN ALFA Y A LA INSULINA

C. Rodríguez-Jaén, P. Solís-Muñoz, I. García-Ruiz, T. Díaz-Sanjuán, M.T. MuñozYagüe y J.A. Solís-Herruzo

*Centro de Investigación. Laboratorio de Gastroenterología. Hospital Universitario «12 de Octubre». Madrid. España.*

**Introducción y objetivo:** Entre los factores relacionados con la resistencia al tratamiento combinado de las hepatitis C con interferón alfa (IFNa) y ribavirina figura la obesidad, en la cual las tasas en sangre y en hígado de TNFa están elevadas y existe una resistencia a la insulina. El objetivo del presente estudio está dirigido a conocer si la resistencia a la insulina provocada por el TNFa se asocia con una resistencia simultánea al IFNa.

**Material y métodos:** Todo el estudio ha sido realizado en cultivos primarios de hepatocitos de rata expuestos al TNFa, insulina o IFNa. En estas células valoraremos los efectos del TNFa sobre la sensibilidad a la insulina, analizando la traslocación de Glut4 a la membrana tras la insulina en ausencia o presencia de 20 ng/ml TNFa. En las mismas condiciones experimentales determinamos la fosforilación en tirosina y serina de IRS-1 y en serina de Akt y JNK. Los efectos del TNFa sobre la respuesta al IFNa los analizamos determinando la fosforilación en tirosina de Stat1 y Stat2. Además, valoramos la respuesta de SOCS-3 al TNFa, su fijación a los receptores del IFNa y las consecuencias del silenciamiento de IRS-1 sobre la respuesta al IFNa.

**Resultados:** 1) El tratamiento de los hepatocitos con TNFa se sigue de una anulación de la respuesta a la insulina valorada ésta por la ausencia de traslocación de Glut4 a la membrana celular y

de fosforilación en tirosina de IRS-1 y en serina de Akt inducidas por la insulina. El TNFa provoca una marcada fosforilación de JNK; 2) el interferón provoca un aumento de la fosforilación de Stat-1 y de Stat-2, que es especialmente marcado a los 30 minutos. Este efecto es anulado completamente por el pretratamiento de los hepatocitos con 20 ng/ml de TNFa durante 60 minutos; 3) para diferenciar si esta inhibición de la señalización del IFNa por el TNFa es un efecto directo de esta citoquina o es secundario a la resistencia a la insulina, bloqueamos la transmisión de la señal de la insulina mediante el silenciamiento de IRS-1 con siRNA-IRS-1. El tratamiento de los hepatocitos con IRS-1 silenciado mostró que responden normalmente al IFNa, y 4) el TNFa aumenta la concentración de SOCS-3 en el medio de cultivo, facilita su unión al receptor del IFNa y bloquea la transmisión de señal de esta citoquina.

**Conclusiones:** El TNFa provoca una resistencia a la insulina que está mediada por la fosforilación en serina del IRS-1, probablemente a través de activación de JNK. Simultáneamente, interfiere con la señalización del IFNa, pero este efecto es independiente del que tiene sobre la señalización intracelular de la insulina. La resistencia al IFNa provocada por el TNFa parece estar mediado por el SOCS-3 liberado al medio de cultivo por hepatocitos expuestos al TNFa.

#### LA SOBREEXPRESIÓN DE NOS-3 INDUCE UN INCREMENTO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR AGONISTA ANTI-FAS EN LAS CÉLULAS TUMORALES DE HEPATOBLASTOMA

J. Muntané<sup>a</sup>, G. Ferrín<sup>a</sup>, R.I. Bello<sup>a</sup>, R. González<sup>a</sup>, A.B. Hidalgo<sup>a</sup>, I. Ranchal<sup>a</sup>, S. González<sup>a</sup>, P. Barrera<sup>a</sup>, M. de la Mata<sup>a</sup> y B. Zhivotovsky<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Liver Research Unit. Hospital Reina Sofía. Córdoba. España.

<sup>b</sup>Institute of Environmental Medicine. Division of Toxicology. Karolinska Institutet. Stockholm.

**Introducción:** La estimulación de fas es una ruta primordial de muerte celular en hepatocitos. La regulación de la producción de óxido nítrico intracelular es esencial para la supervivencia de las células tumorales. El objetivo del estudio fue determinar el isoenzima de la óxido nítrico sintasa (NOS) presente en las células hepatoblastoma humanas, así como caracterizar la alteración de la señal intracelular de muerte celular como consecuencia de la sobreexpresión estable de la NOS en HepG2.

**Material y métodos:** La muerte celular se indujo con agonista anti-fas (0,5 microg/ml) en células HepG2 control, y transfecadas con el plásmido pcDNA 3,1 con y sin inserto de la región codificante de la NOS. La inhibición de la producción de óxido nítrico se realizó mediante la administración de L-NAME (5 mM) 24 horas antes de la inducción de muerte celular por anti-fas. Se determinó la expresión (proteína y mRNA) de la NOS-1, NOS-2 y NOS-3 en células HepG2. La actividad de la caspasa-3, 8 y 9 se cuantificó mediante sustrato fluorescente y por la detección de su fragmento activo por Western-blot. La expresión del receptor de fas se valoró en el liso celular. La unión del inhibidor de fas (flip) al receptor se determinó mediante inmunoprecipitación del receptor fas, y su posterior valoración por Western-blot.

**Resultados:** No se detectaron niveles significativos de NOS-1 y NOS-2 en HepG2, con lo cual se estableció la línea de hepatoblastoma con sobreexpresión estable de NOS-3. La inducción con agonista anti-fas inducía la disminución de la unión de flip al receptor fas e incrementaba la actividad caspasa-3, -8 y -9 en células HepG2. La sobreexpresión de NOS-3 indujo un aumento muy importante de la expresión del receptor de fas, así como de un incremento moderado de la cantidad de flip unido a fas. Este desequilibrio celular en el patrón de expresión del complejo fas/flip se relacionó con un incremento de la actividad caspasa-3, -8 y -9 en las células HepG2.

tratadas con agonista fas. La inhibición de la NOS reducía la expresión de fas y flip.

**Conclusión:** La sobreexpresión de NOS-3 induce un incremento de la proporción de fas vs flip que se traduce en un incremento de la muerte celular inducida por fas en las células tumorales de hepatoblastoma.

#### MOTIVOS DEL FALLO DEL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C CON INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA

M. García-Retortillo, I. Cirera, M.D. Giménez, C. Márquez, P. Castellví, S. Coll, N. Cañete, F. Bory y R. Solà

*Sección de Hepatología. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital del Mar. IMIM. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.*

**Introducción:** Los conceptos de recaída y no respuesta tras el fallo del tratamiento antivírico de la hepatitis C no aportan información sobre los motivos del fracaso del tratamiento la cual puede resultar muy útil a la hora de plantear un posible retratamiento.

**Objetivo:** Investigar los motivos de fallo del tratamiento en pacientes naïve con hepatitis crónica C.

**Método:** Hemos incluido 389 pacientes consecutivos con hepatitis C (biopsia hepática 91%), que iniciaron tratamiento con IFN-PEG y RBV con dosis habituales entre junio de 2001 y enero de 2007. La duración del tratamiento fue 48 semanas en genotipos 1/4 y 24 en 2/3. En todos los pacientes se determinó el ARN-VHC antes, a las 12, 24 semanas, al finalizar el tratamiento y 24 semanas después (RVS). El tratamiento se suspendió a las 12 semanas en aquellos pacientes con disminución de la carga viral < 2 log en semana 12 y en los que presentaban ARN-VHC positivo en semana 24. Los pacientes que no alcanzaron RVS se clasificaron en 4 grupos, A: Incumplimiento del tratamiento por parte del paciente; B: Reducción de dosis por efectos secundarios (dosis total < 80% de la prescrita en alguno de los dos fármacos); C: Negativización tardía del ARN-VHC (1er. ARN indetectable en semana 12 o 24); D: Ausencia completa de respuesta (ARN-VHC detectable durante el período de tratamiento). En los grupos C y D las dosis administradas de ambos fármacos debían ser superiores al 80%.

**Resultados:** La tasa de RVS fue 67,6% (G1: 56,2%; G2: 77,8%; G3: 85,7%; G4: 60%). En la tabla aparecen los motivos de fallo del tratamiento en los 126 pacientes sin RVS.

Presentaron recidiva 6 meses después del tratamiento 1 (6,6%) paciente del grupo A, 12 (42,8%) del grupo B y 42 (95,4%) del grupo C. La reducción de dosis (Grupo B) fue debida a causas hematológicas en 20, trastornos psiquiátricos en 4, hipertiroidismo en 3 e infección en 1 caso. En los 44 pacientes del grupo C, el ARN-VHC resultó negativo en la semana 12 en 19 pacientes (43,2%) y en la semana 24 en los 25 restantes (56,8%). Presentaban fibrosis avanzada (grado 3/4) 4 (16%) pacientes del grupo A, 11 (44%) del grupo B, 10 (40%) del grupo C y 15 (37,5%) del grupo D (P: NS).

**Conclusiones:** La ausencia completa de respuesta virológica aparece en sólo una tercera parte de los casos que fallaron al tratamiento y en un 10% del total de los tratados. Los pacientes restantes pueden ser candidatos a un retratamiento si pueden corregirse las causas que motivaron el fallo terapéutico.

#### NUEVAS TERAPIAS MOLECULARES DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR: BLOQUEO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE IGF

V. Tovar<sup>a</sup>, C. Alsinet<sup>a</sup>, A. Villanueva<sup>a</sup>, J. Peix<sup>a</sup>, D. Chiang<sup>b</sup>, M. Solé<sup>a</sup>, S. Toffanin<sup>c</sup>, S. Thung<sup>c</sup>, S. Moyano<sup>a</sup>, M. Schwartz<sup>c</sup>, V. Mazzaferro<sup>d</sup>, J. Bruix<sup>a</sup> y J.M. Llovet<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>BCLC Group. [Laboratori de Recerca Translacional d'Oncología Hepática, <sup>a</sup>Servicio de Hepatología]. Hospital Clinic. CIBERehd, IDIBAPS. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Cancer Program. Broad Institute. Boston. USA.

<sup>c</sup>Mount Sinai Liver Cancer Program. Division of Liver Diseases. Mount Sinai School of Medicine. Nueva York. USA.

<sup>d</sup>Istituto Nazionale dei Tumori. Milan. Italia.

**Introducción:** Los factores de crecimiento semejante a la insulina tipo I y II (IGF-I, IGF-II) estimulan la proliferación y la supervivencia celular al activar el receptor IGF de tipo I (IGF-1R) y las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK. Evidencias epidemiológicas y experimentales revelan el papel del sistema de IGF en el desarrollo de una amplia variedad de neoplasias.

**Objetivos:** 1) Identificar los mecanismos moleculares que implican la vía de señalización de IGF en la patogenia del carcinoma hepatocelular (CHC) inicial, y 2) evaluar la eficacia anti-tumoral de nuevas terapias selectivas anti-IGF-1R en CHC.

**Métodos:** Se evaluó la activación de la vía de señalización de IGF en 104 CHCs y 10 muestras control por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (7 genes) e inmunohistoquímica (6 proteínas). Se determinó la expresión de IGF-II derivada del promotor adulto (P1) y los promotores fetales (P3, P4) por RT-PCR. Mediante plataformas de microarray (Affymetrix U133 2,0p) y *gene set enrichment* (GSEA) se identificó una firma molecular asociada a la activación de IGF. Las aberraciones cromosómicas se analizaron por SNP-array (Affymetrix STY Mapping Arrayp). Se incubaron cuatro líneas de cáncer hepático con un inhibidor selectivo de IGF-1R [anticuerpo monoclonal IMC-A12] para evaluar viabilidad celular (MTT), proliferación celular (incorporación de timidina tritiada) y ciclo celular (FACS). Se generó un modelo de xenoinjerto de CHC en ratones atípicos para evaluar *in vivo* el efecto de A12 (n = 22) vs un grupo control (n = 12).

**Resultados:** La vía de señalización de IGF está activada (pIGF1R-positiva) en el 21% de los CHCs, lo que se correlaciona con la activación de mTOR (pS6-positiva, p = 0,03) y los niveles de ARNm de IGF-II (p = 0,03). La expresión de IGF-II está incrementada > 10 veces en el 12% de los CHCs como consecuencia de la re-activación de los promotores fetales P3 y P4; mientras que la expresión de IGFBP-3 e IGF-I están disminuidas de forma generalizada (p < 0,001). Se observó pérdida aleática del locus IGF-2R en 25/102 muestras. Se identificó una firma molecular que refleja activación de IGF-1R compuesta por genes implicados en proliferación celular, supervivencia, migración y progresión del ciclo celular. El bloqueo de vía de señalización con A12 disminuyó la viabilidad celular un 35% y la síntesis de ADN un 15-30%. En el modelo de xenoinjerto, el tratamiento con A12 retrasó significativamente el crecimiento tumoral y mejoró la supervivencia (mediana 22 días vs 16 días en grupo control, p = 0,04) al inducir apoptosis y disminuir la proliferación celular.

	Global	G1 (n = 90)	G 2/3 (n = 23)	G4 (n = 14)
A Incumplimiento	15 (11,9)	10 (11,2)	4 (17,4)	1 (7,1)
B Reducción dosis	28 (22,2)	22 (24,7)	2 (8,7)	4 (28,5)
C Negativización tardía	44 (34,9)	26 (29,2)	16 (69,6)	2 (14,4)
D Ausencia de respuesta	39 (30,9)	31 (34,8)	1 (4,3)	7 (50)

**Conclusión:** La vía de señalización de IGF está activada en un 21% de los pacientes de CHC como consecuencia de la sobreexpresión de IGF-II y pérdidas alélicas de IGF-2R. El bloqueo selectivo de la activación de IGF-1R con A12 representa una aproximación terapéutica prometedora para el tratamiento del carcinoma hepatocelular, y constituye la base racional para evaluar estos tratamientos en fases clínicas.

## UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DEL HBsAg SÉRICO EN PORTADORES INACTIVOS DEL VHB

L.G. Diéguez<sup>a</sup>, D. González<sup>b</sup>, L. García-Isidro<sup>a</sup>, M. Rodríguez<sup>b</sup>, M. Oña<sup>b</sup>, L. Rodrigo<sup>a</sup> y M. Rodríguez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Hepatología. Hospital Universitario Central de Asturias. España.

<sup>b</sup>Virología. Hospital Universitario Central de Asturias. España.

**Introducción:** Recientemente se ha introducido una técnica para cuantificar el HBsAg sérico, cuya utilidad en la práctica clínica no está establecida.

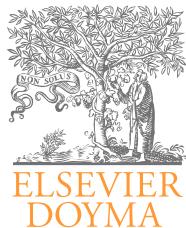
**Objetivo:** Conocer los niveles de HBsAg séricos en portadores inactivos del VHB y establecer si su cuantificación puede ser útil para predecir la resolución de la infección.

**Pacientes y métodos:** Se estudiaron 68 portadores inactivos del VHB, 51% varones, con edad media de  $45 \pm 15$  años. El diagnóstico de portador inactivo se basó en: presencia de HBsAg por técnicas cualitativas, ausencia de HBeAg, normalidad de AST/ALT y DNA-VHB sérico  $< 10^4$  cop/ml, confirmados en varios controles y en ausencia de tratamiento antiviral. En todos ellos se descartó coinfección por VHC, VHD y VIH y se realizó una determinación basal de DNA-VHB por PCR-TR (Cobas TaqMan VHB) y de HBsAg por técnica cuantitativa

(Architect HBsAg; Abbott), con un límite inferior de detección de 0,05 UI/ml; en todos los casos con valores  $> 250$  UI/ml se procedió a una nueva determinación, tras dilución de la muestra. Los pacientes fueron seguidos prospectivamente a intervalos regulares (6-12 meses), con un seguimiento medio de  $23 \pm 8$  meses.

**Resultados:** Inicialmente, 42/68 (62%) fueron DNA-VHB positivo. Los títulos de HBsAg variaron ampliamente ( $627 \pm 1.208$  UI/ml), pero fueron significativamente mayores en pacientes DNA-VHB positivo ( $2,8 \pm 1,6 \log_{10}$  UI/ml) que en aquellos sin replicación viral ( $0,9 \pm 1,7$ ) ( $p = 0,0001$ ). Durante el seguimiento, 15 pacientes negativizaron el HBsAg, ocurriendo este hecho con mayor frecuencia en los DNA-VHB negativo (32% a 2 años) que en los DNA-VHB positivo (3% a 2 años) ( $p = 0,0001$ ). Por otra parte, los títulos iniciales de HBsAg en los pacientes que negativizaron el HBsAg durante el seguimiento fueron inferiores ( $0,46 \pm 1,36 \log$ ) a los observados en aquellos que no aclararon el HBsAg ( $2,63 \pm 1,7 \log$ ) ( $p = 0,0001$ ). El valor con mayor capacidad discriminante para la negativización del HBsAg fue  $3 \log_{10}$  UI/ml. A los 24 meses de seguimiento ninguno de los pacientes con  $> 3 \log$  negativizó el HBsAg, frente a un 25% de los que tenían  $< 3 \log$  ( $p = 0,008$ ). La probabilidad acumulada de negativizar el HBsAg a 2 años fue del 43% en pacientes con DNA-VHB negativo y HBsAg  $< 3 \log$  y del 3% en aquellos con DNA-VHB positivo y/o HBsAg  $< 3 \log$  ( $p = 0,0001$ ).

**Conclusiones:** Los niveles de HBsAg en portadores inactivos del VHB varían ampliamente, pero existe una correlación entre dichos niveles y la presencia o ausencia de replicación viral. La cuantificación del HBsAg parece útil para predecir la resolución de la infección en un período relativamente corto de tiempo. La determinación conjunta del DNA-VHB y la cuantificación del HBsAg permiten establecer un estadio dentro de la fase de portador inactivo caracterizado por la ausencia de replicación y bajos niveles de HBsAg que precede a la curación de la infección.



## COMUNICACIONES ORALES

### XXXIV Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 25-27 de febrero de 2009

#### Sesión general 5

Moderadores: Joan Córdoba (Barcelona) y Àngels Escorsell (Barcelona)

#### EL BLOQUEO CRÓNICO DEL RECEPTOR DE LA APELINA REDUCE LA ANGIOGÉNESIS Y LA FIBROSIS EN LAS RATAS CIRRÓTICAS CON ASCITIS

P. Melgar-Lesmes<sup>a</sup>, A. Príncipe<sup>a</sup>, G. Fernández-Varo<sup>a</sup>, J. Ros<sup>a</sup>, V. Arroyo<sup>b</sup>, M. Morales-Ruiz<sup>a</sup> y W. Jiménez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica y Genética Molecular. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Unidad de Hepatología-Institut de Malalties Digestives. Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. IDIBAPS. CIBERehd. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

**Introducción:** La apelina (AP) es un péptido que desempeña un importante papel en la fisiología y patofisiología cardíaca, en la inflamación y en la angiogénesis. Previos estudios han demostrado que los pacientes y las ratas con cirrosis poseen unos niveles circulantes elevados de esta sustancia. Además, la expresión de AP y su receptor (rAP) se encuentra selectivamente activada en el hígado de las ratas cirróticas.

**Objetivos:** 1) Evaluar si el sistema endógeno de la AP está involucrado en la patogénesis del remodelado hepático y en las complicaciones cardiovasculares que ocurren en la enfermedad hepática, y 2) investigar el origen celular de la AP y la localización del rAP en el hígado de ratas cirróticas y animales control.

**Métodos:** Se asignaron al azar 16 ratas cirróticas con ascitis en dos grupos de animales: Grupo 1: recibió una inyección sc diaria del antagonista del rAP (F13A, 75 µg/kg, n = 8) durante 9 días; Grupo 2: recibió vehículo (solución salina, 1 ml/kg, n = 8) durante el mismo período. Al final del tratamiento se registró la presión arterial media (PAM), el gasto cardíaco (GC) y la presión portal (PP). Se procesaron muestras de tejido hepático de los animales tratados y de los vehículo para tinción por Sirius red y factor Von Willebrand. La localización hepática de la AP y del rAP se examinó en ratas cirróticas y control mediante inmunohistoquímica. Para determinar si el origen celular de la AP podría ser la célula estrellada hepática (CEH), se realizó una colocalización de α-actina y AP en hígado de ratas cirróticas mediante técnicas de inmunofluorescencia.

**Resultados:** Las ratas cirróticas tratadas con F13A mostraron una menor fibrosis hepática (15,7 ± 1,0 vs 20,8 ± 0,8 area fibró-

tica, p < 0,01) y densidad vascular (12 ± 1 vs 20 ± 1 vasos/área, p < 0,01) respecto a las ratas vehículo. Además, los animales tratados experimentaron una mejoría en la PAM (de 82,3 ± 3,6 a 97,7 ± 3,5 mmHg, p < 0,02) y CO (de 414 ± 17 a 322 ± 25 ml/min, p < 0,02) sin cambios significativos en la PP (13,7 ± 0,9 vs. 13,8 ± 1,0 mmHg). Los experimentos de colocalización revelaron que las CEH localizadas en el margen de los septos fibrosos eran el principal origen de la AP en los animales cirróticos. Mientras que el rAP fue detectado en todo el parénquima hepático en las ratas cirróticas, solamente se localizó en el área perivenular en los animales control.

**Conclusión:** Las ratas cirróticas tratadas crónicamente con el antagonista del rAP muestran una notable mejoría en la fibrosis hepática, en la angiogénesis y en los parámetros cardiovasculares. Por tanto, más allá de sus efectos cardiotrópicos y vasodilatadores, la AP puede comportarse como una sustancia paracrina en el hígado cirrótico, siendo secretada por las CEH, interactuando con las células parenquimales cercanas y, de este modo, estimulando vías de señalización implicadas en inflamación y angiogénesis. Estos resultados apuntan al sistema de la AP como una nueva diana terapéutica en la enfermedad hepática.

#### EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ADN-VHB Y ARN-VHD MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL: PERFILES COMPLEJOS DE INTERACCIÓN VIRAL

M. Schaper<sup>a,b</sup>, D. Tabernero<sup>a,b</sup>, M. Homs<sup>a,b</sup>, R. Jardí<sup>a,b,c</sup>, F. Rodríguez-Frías<sup>a,b,c</sup>, M. Somolinos<sup>c</sup>, R. Esteban<sup>a,b,d</sup> y M. Buti-Ferret<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup>Ciberehd. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas. Ministerio de Sanidad y Consumo. Barcelona. España.

<sup>b</sup>ViRgil. European Network of Excellence on Antiviral Drug Resistance (ViRgil LSHM-CT-2004-503359). Barcelona. España.

<sup>c</sup>Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona. España.

<sup>d</sup>Servicio de Hepatología. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona. España.

**Introducción:** La coinfección por los virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis Delta (VHD) se asocia a menudo con formas severas de enfermedad hepática. Sin embargo, el conocimiento de las implicaciones clínicas y virológicas de estos virus en el daño hepático es limitado.

**Objetivos:** Desarrollar y evaluar un método para cuantificar el ARN-VHD basado en PCR a tiempo real con un paso previo de PCR de transcripción inversa (RT-PCR) utilizando el analizador Light-Cycler™. Este método se utilizará juntamente a la cuantificación de ADN-VHD para determinar los perfiles virológicos en pacientes, no tratados, con coinfección crónica por los VHB y VHD.

**Pacientes y métodos:** Se han incluido en el estudio 42 pacientes con infección crónica por VHB y VHD (estudio transversal). En 25 casos se ha realizado un estudio retrospectivo longitudinal de los niveles de ADN-VHD y ARN-VHD. El ARN-VHD ha sido cuantificado por PCR a tiempo real con un paso previo de RT-PCR en el sistema LightCycler™, utilizando sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia, complementarias a la zona autocatalítica del genoma del VHD. El ADN-VHD se determinó mediante PCR a tiempo-real (sensibilidad 500 copias/mL). En el estudio longitudinal se han procesado 298 muestras de suero.

**Resultados:** La curva estándar para el ARN-VHD era lineal en el rango entre  $10^3$  y  $10^8$  equivalentes/mL. Los coeficientes de variación para dos puntos de  $10^4$  y  $10^7$  equivalentes/mL fueron: intra-ensayo inferior al 6% e inter-ensayo inferior al 8%. El estudio transversal detectó infección activa por los dos virus en 19 casos (45,2%), infección inactiva por VHB/activa por VHD en 12 (28,6%), activa por VHB/inactiva por VHD en 7 (17%), e inactiva por los dos virus en 4 casos (10%). Estos resultados cuestionan el intenso efecto supresor del VHD sobre el VHB descrito previamente, y muestran el importante papel que el VHB tiene en la coinfección. El estudio longitudinal confirmó estos resultados mostrando además 7 diferentes perfiles de interacción, con una alta frecuencia de actividad fluctuantes de ambos virus incluyendo la predominancia alternativa de actividades. En el 24% de los casos la mediana de los niveles de ADN-VHD y de ARN-VHD observada en el estudio longitudinal era significativamente diferente de la observada en el estudio transversal, indicando el riesgo de una interpretación incorrecta de la interacción entre el VHB y el VHD cuando ésta se valora mediante una determinación aislada.

**Conclusiones:** El método cuantitativo para la determinación de ARN-VHD en el sistema LightCycler™ es práctico, sensible y reproducible, con un rango amplio de detección. El análisis longitudinal del ADN-VHD y ARN-VHD evidencia la compleja interacción entre los dos virus. La evaluación de la carga viral de los VHB y VHD mediante un método sensible es esencial para comprender la fisiopatología de la coinfección por VHB y VHD y en consecuencia para la implantación de medidas terapéuticas.

#### IDENTIFICACIÓN DE UN CRITERIO QUE DEFINE A LAS CUATRO SEMANAS LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C

J. Aguilar Reina<sup>a</sup>, C. Verdejo<sup>a</sup> y A. Fernández Palacín<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Aparato Digestivo. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla. España.

<sup>b</sup>Bioestadística. Departamento de Medicina Preventiva. Universidad de Sevilla. Sevilla. España.

**Introducción:** La respuesta precoz (RP) [descenso de la carga viral  $\geq 2 \log_{10}$  a las 12 semanas respecto a la basal] al tratamiento con IFN-pegilado (IFNpg) y ribavirina es un criterio fundamental por su valor predictivo negativo respecto a la respuesta sostenida, y su ausencia permite suspender el tratamiento. Tendría importancia identificar un valor de viremia, antes del tercer mes, que permitiera retirar el tratamiento más precozmente que esperando a la RP. **Objetivo:** Determinar un valor de corte del descenso de la carga viral a la 4.<sup>a</sup> semana de tratamiento que sea capaz de predecir la respuesta a la semana 12, momento al que hay que esperar actualmente para decidir.

**Pacientes y métodos:** Entre enero de 2006 y diciembre de 2007 iniciaron tratamiento con IFN pegilado alfa 2 a y ribavirina (dosis según peso) 144 pacientes. Sólo se incluyeron los que habían recibido el tratamiento a dosis completa hasta las 12 semanas al menos. Se determinó carga viral basal, durante las 24 horas anteriores a la administración de la cuarta dosis de IFNpg (4.<sup>a</sup> semana) y a las 12 semanas de tratamiento. Se realizó estudio estadístico comparando el descenso de la carga a las 4 semanas respecto a la carga basal y la posterior presencia o ausencia de RP, determinando la sensibilidad y especificidad de los valores obtenidos. Se realizó estudio univariante y regresión logística considerando otros factores: genotipo, índice de masa corporal, consumo de alcohol, fibrosis hepática, edad, sexo y carga viral basal.

**Resultados:** Se excluyó a 8 pacientes (5 por no contar con las tres determinaciones de ARN-VHC exigidas y 3 por reducción de la dosis). El resto, 136 pacientes, constituyeron la cohorte (genotipo 1: 70,5%; carga viral basal: Me 674.000 [252.500-1.737.500]). Para la cohorte completa, el descenso  $\geq 1,5711 \log_{10}$  a las 4 semanas presentó sensibilidad = 1 y especificidad = 0,767; el área bajo la curva COR fue de 0,913 ( $p < 0,0005$ ). Cuando se considera únicamente el subgrupo infectado por genotipo 1, el mismo valor de descenso de la carga presenta sensibilidad = 1 y especificidad = 0,712, y el área bajo la curva COR es 0,87 ( $p < 0,0005$ ). La única variable que se relaciona independientemente con la respuesta, además del descenso de la carga  $\geq 1,5711 \log_{10}$ , es la fibrosis hepática.

**Conclusiones:** Se ha encontrado un valor de descenso de la viremia al primer mes de tratamiento por debajo del cual se habría podido retirar la medicación a las 4 semanas al 78% del total de los pacientes (71% de los infectados con genotipo 1) que no habrían respondido a las 12 semanas, con el 100% de acierto; y se habría tratado sólo el 29%, hasta la semana 12, de los que no tendrían RP. Esto supone ahorro de medicación, recursos y efectos secundarios en un porcentaje muy alto de pacientes que no tendrán respuesta posteriormente. Así mismo, puede animar a iniciar el tratamiento a un mayor número de pacientes ante la posibilidad de tener una predicción fiable a las 4 semanas.

#### LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (EPC) GENÉTICAMENTE INGENIERIZADAS POR VECTORES ADENOVIRALES SON RECLUTADAS POR EL TUMOR Y TIENEN ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN UN MODELO ORTOTÓPICO DE TUMOR HEPÁTICO

V. Fernández-Ruiz<sup>a</sup>, M.P. Kawa<sup>a</sup>, B. Sangro<sup>a,b</sup>, J. Prieto<sup>a,b</sup> y C. Qian<sup>a</sup>

<sup>a</sup>División de Hepatología y Terapia Génica del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Pamplona. España.

<sup>b</sup>CIBERehd. Instituto Carlos III. Universidad de Navarra. Clínica Universitaria. Pamplona. España.

**Introducción y objetivos:** La angiogénesis tumoral puede ocurrir mediante la proliferación y migración de las células endoteliales de los vasos circundantes, o a nivel sistémico por la movilización de las EPC de médula ósea, que migran a los lugares de angiogénesis y se incorporan a los vasos sanguíneos en formación. El objetivo de este estudio es determinar si las EPC modificadas genéticamente por vectores adenovirales pueden ser reclutadas por el tumor y si si pueden utilizarse como agente terapéutico para el tratamiento del cáncer.

**Métodos:** Las EPC se aislaron mediante la diferenciación de las células mononucleares de médula ósea de ratones C57BL/6 durante 7 días, en presencia de un medio basal endotelial (EBM-2) suplementado con VEGF, bFGF, IGF-I, EGF e hidrocortisona. El tumor hepático ortotópico se estableció mediante la implantación de células MC38 en el hígado de ratones C57BL/6 singénicos. Las EPC se infectaron con adenovirus de primera generación portadores de un

gen reportero como GFP o luciferasa, o un gen terapéutico como la interleuquina-12 (IL-12). El reclutamiento de las EPC-Luciferasa (EPC-Luc) se monitorizó por bioluminiscencia CCD-IVIS y por inmunohistoquímica (IHC) en el tejido tumoral. Se evaluó la eficacia terapéutica de las EPC que expresan IL-12 (EPC IL-12).

**Resultados:** Las EPC murinas mostraron un fenotipo Sca-1+, VEGFR2+, CD34+, VE-cadherina+, Meca-32+, vWF+, CD106+, CD31+, c-Kit+ e Id1+, y características funcionales específicas como la captación del LDL acetalado, la unión de Lectina Ulex y la formación de túbulos sobre matriz. La infección de las EPC con adenovirus resultó en una elevada eficiencia de transducción sin afectar a su viabilidad celular o fenotipo. El análisis de bioluminiscencia *in vivo* demostró una elevada actividad luciferasa en el tumor a los 7 días tras la administración de las EPC-Luc, que se localizaron en la periferia del tumor por IHC. Se estudiaron los mecanismos del reclutamiento de las células al tumor como la expresión, en tumor e hígado, del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor alfa inducible por hipoxia (HIF-1a), y el factor derivado del estroma (SDF-1). El tejido tumoral mostró un incremento significativo de la expresión de VEGF, HIF-1a y SDF-1 en comparación con el parénquima hepático circundante. El SDF-1 es el ligando del receptor CXCR4, cuya expresión se detectó en las EPC. El tratamiento de los tumores con EPC IL-12 produjo una reducción significativa del tamaño tumoral. Se detectó un nivel elevado de células activadas CD8+CD44+ y CD8+Tetrámeros+ en el bazo de los ratones tratados con EPC IL-12.

**Conclusión:** Nuestros resultados muestran que las EPC son reclutadas a los tumores y son capaces de desarrollar actividad antitumoral cuando son ingenierizadas con IL-12. Este estudio proporciona una estrategia novedosa para el tratamiento del cáncer hepático utilizando células como transportadoras de vectores codificantes de genes con efecto antitumoral.

## PREVALENCIA Y FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO EN POBLACIÓN ADULTA APARENTEMENTE SANA EN ATENCIÓN PRIMARIA

Ll. Caballería<sup>a,b</sup>, G. Pera<sup>b</sup>, M.A. Auladell<sup>a,b</sup>, P. Torán<sup>b</sup> y L. Muñoz<sup>b</sup>; en nombre del Grupo para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas en Atención Primaria

<sup>a</sup>Equipo de Atención Primaria de Premià de Mar del Instituto Catalán de la Salud. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Unidad de Soporte a la Investigación en Atención Primaria Barcelonès Nord i Maresme. IDIAP Jordi Gol. Barcelona. España.

**Introducción:** La prevalencia del hígado graso no alcohólico (HGNA) es desconocida en nuestro país y detectar los pacientes que la presentan servirá para incidir en los factores asociados y evitar su evolución a formas más severas.

**Objetivos:** Conocer la prevalencia y factores asociados a HGNA y su relación con el síndrome metabólico (SM). **Diseño:** Estudio transversal, multicéntrico y de base poblacional.

**Material y métodos:** Individuos entre 15-80 años escogidos aleatoriamente asignados a 18 centros de atención primaria del Barcelonès Nord y Maresme (Barcelona). A todos los sujetos se les practicó exploración física determinando el índice de masa corporal (IMC), perímetro abdominal y presión arterial, analítica y ecografía hepática. Se excluyeron los sujetos con consumo de alcohol > 30 gr/día (hombres) y > 20 gr/día (mujeres) y los sujetos con enfermedad hepática conocida.

**Resultados:** 766 individuos con edad media de  $53 \pm 14$  años (rango 17-80 años). 57,8% mujeres y 42,2% hombres. 198 presentaban HGNA por criterios ecográficos (prevalencia 25,8%), 33,4% en hombres y 20,3% en mujeres ( $p < 0,001$ ). 30% consumían alcohol dentro de los límites establecidos en los criterios de inclusión, con una media de consumo de  $8,89 \pm 6,83$  unidades de bebida estándar por

semana. La prevalencia de los factores potencialmente asociados al HGNA fue 25,2% obesidad, 44,0% sobrepeso, 19,8% diabetes, 19,5% HTA, 22,1% HDL, 21,2% triglicéridos, 11,1% ALAT, 20,5% GGT, 12,4% resistencia a la insulina (RI) y 13,6% SM según NCEP-ATPIII. Las variables asociadas significativamente al HGNA en el análisis multivariado mediante regresión logística fueron sexo masculino (OR: 2,00, IC 95%: 1,36-2,92), edad (OR: 1,03 por año, IC 95%: 1,02-1,05), SM (OR: 2,38, IC 95%: 1,42-3,98), RI (OR: 4,87, IC 95%: 2,85-8,32) y ALAT (OR: 2,73, IC 95%: 1,57-4,77). El consumo moderado de alcohol no se relacionó con HGNA, aunque los factores asociados a HGNA mostraron un efecto mayor entre los abstemios que entre los que consumían cantidades moderadas de alcohol. Sustituyendo el SM por cada uno de sus componentes, estos también se asociaron significativamente con HGNA, con unos valores de OR alrededor de 1,7-2.

**Conclusiones:** El HGNA es muy prevalente en la población general. El sexo masculino, la edad, el SM, la resistencia a la insulina y la ALAT son los factores que se asocian a HGNA.

## RASTREO MUTACIONAL DEL GEN DE LA GLUTAMINASA: UN MICROSATÉLITE EN EL PROMOTOR DEL GEN PREDICE EL RIESGO DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

M. Jover<sup>a</sup>, J.J. Galán<sup>b</sup>, E. Hoyas<sup>a</sup>, J.A. del Campo<sup>a</sup>, C. Montoliu<sup>d</sup>, J. del Olmo<sup>d</sup>, E. Baccaro<sup>e</sup>, M. Guevara<sup>a</sup>, J. Córdoba<sup>f</sup>, J.M. Navarro<sup>a</sup>, I.M. Méndez<sup>g</sup>, M.C. Martínez-Sierra<sup>h</sup>, L. Grande<sup>a</sup>, B. Pardo<sup>a</sup>, I. Camacho<sup>c</sup>, A. Ruiz<sup>b</sup> y M. Romero-Gómez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>UGC Enfermedades Digestivas y CIBEREHD. España.

<sup>b</sup>Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario de Valme. Sevilla. España.

<sup>c</sup>Departamento de Genómica Estructural. Neocodex. Sevilla. España.

<sup>d</sup>Digestivo. Hospital Clínico de Valencia. Valencia. España.

<sup>e</sup>Digestivo-CIBERehd. Hospital Clínic. Barcelona. España.

<sup>f</sup>Digestivo-CIBERehd. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

<sup>g</sup>Servicio de Digestivo. Hospital Costa del Sol. Marbella. Málaga. España.

<sup>h</sup>Servicio de Digestivo. Hospital Puerta del Mar. Cádiz. España.

**Objetivo:** Búsqueda de una posible mutación germinal en el gen de la glutaminasa asociada al riesgo de desarrollar encefalopatía hepática.

**Material y métodos:** Se ha realizado un rastreo mutacional de la secuencia codificante (18 exones) y las regiones no traducidas en 5' y 3' (5'UTR y 3'UTR) del gen *GLS*, en un total de 20 cirróticos seleccionados atendiendo a su *background haplotípico* (TACC). El estudio se ha realizado mediante las técnicas de *High-Resolution Melting (HRM)* y secuenciación directa. Hemos incluido una cohorte de estimación ( $n = 100$ ) de riesgo de encefalopatía hepática y una cohorte de validación ( $n = 156$ ) de pacientes cirróticos consecutivos seguidos en las consultas de 6 hospitales españoles. Las cohortes de estimación y valoración fueron similares en cuanto a la distribución por sexo, edad, función hepática y tasa de desarrollo de encefalopatía hepática. Diagnosticamos EHM mediante la medición de la frecuencia crítica de parpadeo (FCP) (Hepatonorm™ Analyzer, R&R Medi-Business Freiburg GmbH, Freiburg, Germany), se diagnosticó EHM en pacientes con  $FCP < 38$  Hz. Medimos el área bajo la curva de amonio tras la ingesta de 10 gramos de L-glutamina, basal y a los 60 minutos. El área bajo la curva (AUC) se consideró alterada cuando fue mayor de  $104$  mg/dL/h. Los pacientes fueron seguidos cada 3 o 6 hasta el desarrollo de encefalopatía hepática, trasplante hepático, exitus o estar libre de complicaciones al final del seguimiento ( $32 \pm 15$  meses). Calculamos el riesgo de encefalopatía mediante el análisis conjunto de la FCP y la SOG.

**Resultados:** Se ha caracterizado un microsatélite localizado en la región 5'UTR del gen con una longitud variable entre 177 pb y

210 pb. Clasificamos el microsatélite en corto (177pb-195pb) y largo (198pb-210pb). No detectamos variantes en la secuencia codificante ni que afecten a la unión intron-exon. En la secuencia 3'UTR analizada se han detectado los polimorfismos previamente descritos. No encontramos relación entre los polimorfismos en la región 3'UTR y el riesgo de encefalopatía. En la cohorte de estimación (n = 100) encontramos una asociación entre la presencia del microsatélite largo-largo y el riesgo de desarrollar EH en el seguimiento (log-rank: 7,74; p < 0,005); O.R. 3,9 (IC 95%: 1,4-11,1). En la cohorte de validación se confirmó que este microsatélite en el promotor del gen de la glutaminasa multiplicaba por 3,2 (IC 95%: 1,25-8,3) el riesgo de desarrollar EH en el seguimiento.

**Conclusiones:** La presencia de un microsatélite largo-largo se asocia a un riesgo aumentado de sufrir encefalopatía hepática. El gen de la glutaminasa es estable y presenta escasas alteraciones genéticas en las regiones codificantes. El estudio de este microsatélite puede ser muy útil en la valoración del riesgo de encefalopatía hepática en pacientes con cirrosis.

#### RESPUESTA VIRAL RÁPIDA EN PACIENTES CON HEPATOPATÍA CRÓNICA VIRUS C GENOTIPO 1 TRATADOS CON INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA: FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA Y RELACIÓN CON LA RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA

J.J. Sánchez Ruano, L.R. Martín Escobedo, T. Artaza Varasa, M.J. Pérez Grueso, L. Martín Asenjo y R. Gómez Rodríguez

*Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. España.*

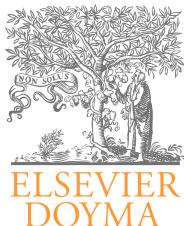
**Introducción:** En la actualidad está perfectamente establecido que la respuesta viral rápida (negativización de la carga viral en la semana 4 de tratamiento) es uno de los factores predictivos de respuesta viral sostenida (RVS) más importantes en el tratamiento

con interferón pegilado (PEG-IFN) y ribavirina (RIB) de los pacientes con hepatopatía crónica virus C (HC HVC). El objetivo del estudio fue establecer los factores predictivos de respuesta viral rápida (RVR) en nuestra serie, así como confirmar la asociación de ésta y la RVS.

**Material y métodos:** Se evaluaron mediante análisis univariable y multivariable de regresión logística en 139 pacientes con HC HVC genotipo 1 los datos epidemiológicos, analíticos, histológicos, virológicos y terapéuticos para establecer los factores predictivos de RVR y la relación de ésta con la RVS.

**Resultados:** De los 139 pacientes (93 varones y 46 mujeres), 49 (35,25%) alcanzaron RVR. De 42 de ellos se dispone en este momento de datos del seguimiento 24 semanas después de finalizar el tratamiento y 37 (88,09%) han conseguido RVS. En el análisis univariado, la edad (41,94 años en los que consiguieron RVR frente a 47,28 en los que no la consiguieron), la carga viral (el 27,17% de los pacientes con alta carga viral consiguieron RVR frente al 51,07% de los que presentaban baja carga viral) y los niveles de GGT (53,47 UI/l en los que consiguieron RVR y 72,06 UI/l en los que no la consiguieron) se mostraron como factores predictivos de respuesta. El estadio de fibrosis (el 21,74% de los pacientes con F4 consiguieron RVR frente al 43,75% de los que presentaban F0) se mostró como factor predictivo de respuesta importante, aunque sin alcanzar significación estadística. El sexo, la vía de contagio, los niveles de transaminasas y ferritina, el tipo de PEG-IFN utilizado o la respuesta a tratamientos previos no influyeron en la consecución de RVR. En el análisis multivariable se mantuvieron como variables independientes de RVR, la edad y la carga viral.

**Conclusiones:** Los datos de nuestra serie confirman la estrecha relación existente entre RVR y RVS. La edad y la carga viral se mostraron como factores predictivos de RVR. Dada la importancia de la consecución de RVR para obtener RVS, de este estudio se desprende que en aquellos pacientes con HC HVC genotipo 1 de mayor edad y que presenten alta carga viral podrían plantearse pautas alternativas de tratamiento a la estándar para intentar conseguir la RVR.



## COMUNICACIONES ORALES

### XXXIV Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Madrid, 25-27 de febrero de 2009

#### Sesión general 6

Moderadores: Raúl Andrade (Málaga) y Carmen Berasain (Pamplona)

#### DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS MIELOIDES DEL SISTEMA INMUNE INTESTINAL EN RATAS CIRRÓTICAS CON ASCITIS

L. Muñoz<sup>a,b</sup>, M. Úbeda<sup>a,b</sup>, M.J. Borrero<sup>a,b</sup>, M. Nieto<sup>a,b</sup>, M. Lario<sup>a,b</sup>, L. Lledó<sup>a</sup>, J. Monserrat<sup>a,b</sup>, E. Sanz<sup>a</sup>, A. de la Hera<sup>a,b</sup>, M. Álvarez-Mon<sup>a,b,c</sup> y A. Albillos<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. Madrid. España.

<sup>b</sup>Ciberherd.

<sup>c</sup>Hospital Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares. Madrid. España.

<sup>d</sup>Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

**Introducción:** La infección bacteriana en cirrosis con ascitis está muy relacionada con la traslocación bacteriana (TB) a ganglios linfáticos mesentéricos (GLM). Entre las causas de la TB se encuentran el sobrecrecimiento bacteriano y el aumento de permeabilidad intestinal. Se desconoce si un daño en el sistema inmune intestinal contribuye a la TB en la cirrosis, y en concreto un defecto en las células dendríticas mieloides (DC), encargadas de fagocitar y transportar antígenos de la pared intestinal a GLM.

**Objetivo:** Estudiar en ratas cirróticas con ascitis por CCl<sub>4</sub> la distribución, estado de activación y función de las DC intraepiteliales (IE), lámina propia (LP) y GLM.

**Resultados:** El número de DC (OX62+RT1B+) aumenta en GLM de ratas cirróticas ( $1.027.585 \pm 571.326$  vs  $1.576.307 \pm 660.316$  cel/cadena GLM,  $p < 0,05$ ), coincidiendo con su disminución en IE ( $6.166 \pm 3.395$  vs  $782 \pm 356$  cel/cm intestino,  $p < 0,01$ ) y en LP ( $833 \pm 403$  vs  $387 \pm 112$  cel/cm intestino,  $p < 0,01$ ). En GLM, las DC muestran signos de activación, como mayor intensidad de expresión de MHC-II ( $408 \pm 175$  vs  $531 \pm 99$ ,  $p < 0,05$ ), y expansión de la subpoblación CD4+ con polarización proinflamatoria ( $47 \pm 12$  vs  $58 \pm 6$ ,  $p < 0,01$ ). La migración de DC de intestino a GLM se demostró administrando oralmente microesferas de látex, cuya frecuencia fue mayor en GLM de ratas cirróticas. Funcionalmente, las DC de ratas cirróticas mostraron menor ( $p < 0,05$ ) capacidad de fagocitar partículas de látex *in vitro* en IE ( $7,9 \pm 3$  vs  $4,9 \pm 1\%$ ), LP ( $5,9 \pm 1$  vs  $3,5 \pm 1\%$ ) y GLM ( $39,9 \pm 11$  vs  $26,5 \pm 6\%$ ). Este defecto en la fagocitosis es independiente del estado de activación de las DC.

**Conclusiones:** En cirrosis, el aumento de la carga antigénica intestinal estimula la maduración de las DC y su migración desde la pared intestinal a los GLM. La menor capacidad fagocítica de las DC del intestino y del GLM es independiente de su estado de maduración y podría contribuir a la mayor TB de la cirrosis.

#### EFEITO PROTECTOR DE CICLOOXYGENASA-2 FREnte AL DAÑO HEPÁTICO AGUDO

R. Mayoral<sup>a</sup>, J.M. Flores<sup>c</sup>, L. Boscá<sup>a</sup>, M. Casado<sup>b</sup> y P. Martín-Sanz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM. Madrid. España.

<sup>b</sup>Instituto de Biomedicina de Valencia. IBV-CSIC. Valencia. España.

<sup>c</sup>Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid. España.

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd).

En este trabajo se ha investigado el efecto de las prostaglandinas (PGs) producidas por la ciclooxygenasa-2 (COX-2) en un daño hepático agudo, utilizando un ratón transgénico que expresa de manera específica la COX-2 humana en el hepatocito. Hemos desarrollado tres modelos experimentales de daño hepático, como son: el daño inducido por lipopolisacárido (LPS) en un ratón tratado previamente con D-galactosamina (LPS/D-GalN), la hepatitis generada por la administración de concanavalina A (ConA) y la proliferación de los hepatocitos en el hígado regenerante después de una hepatectomía parcial (HP). Los datos de este trabajo demuestran que las síntesis de PGs disminuye la susceptibilidad de los hepatocitos al tratamiento con LPS/D-GalN o ConA, como se puede deducir por los niveles significativamente menores de los marcadores pro-inflamatorios y las aminotransferasas plasmáticas en el ratón transgénico, este efecto fue suprimido cuando el animal fue tratado previamente con los inhibidores específicos de COX-2. Los ratones transgénicos expresan niveles altos de proteínas anti-apoptóticas y muestran una activación de proteínas implicadas en la supervivencia celular, como Akt y la quinasa AMP, después del daño hepático. La resistencia al tratamiento con LPS/D-GalN implica una disminución en la activación de las caspasas 3 y 8. La protección frente al daño producido por Con-A implica una reducción en necrosis. Además, la replicación de los hepatocitos está anticipada en el ratón transgénico después de una HP, como indican los marcadores de PCNA y las ciclina D1 y E. Estos resultados muestran, en un modelo genético, que las PGs producidas por COX-2 específicamente en el hígado,

producen una protección muy eficiente frente a un daño hepático agudo por un efecto anti-apoptótico/anti-necrótico y por la aceleración temprana de la proliferación de los hepatocitos.

#### ESTRATEGIA TRANSFUSIONAL RESTRINGIDA O LIBERAL EN PACIENTES CON CIRROSIS Y HEMORRAGIA DIGESTIVA AGUDA

A. Colomo<sup>a,b</sup>, V. Hernández-Gea<sup>a</sup>, E. Muñiz<sup>c</sup>, P. Madoz<sup>d</sup>, C. Aracil<sup>a</sup>, C. Álvarez-Urturi<sup>a</sup>, J. Gordillo<sup>a</sup>, G. Soriano<sup>a,b</sup>, X. Torras<sup>a,b</sup>, S. Sainz<sup>a</sup>, C. Guarner-Argente<sup>a</sup>, E. García-Planella<sup>a</sup>, A. Gallego<sup>a</sup>, C. Villanueva<sup>a,b</sup> y C. Guarner<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Sangrantes. Servicio de Patología Digestiva. Hospital Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Barcelona. España.

<sup>c</sup>Banco de Sangre. Hospital Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

<sup>d</sup>Servicio de Hematología. Hospital Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

**Introducción y objetivo:** Se desconoce la estrategia más adecuada para la reposición de las pérdidas de sangre durante una hemorragia gastrointestinal aguda en el contexto de la cirrosis hepática. Transfundir sangre de manera insuficiente o excesiva puede resultar igualmente perjudicial. La anemia puede desencadenar complicaciones debidas a la hipoxia tisular, pero la transfusión de hemoderivados en la cirrosis, además de su riesgo inherente, podría aumentar el riesgo de recidiva hemorrágica por medio de un efecto rebote en la presión portal. Se ha demostrado que un uso restringido de la transfusión no afecta (o incluso mejora) el pronóstico en situaciones como la cirugía o los pacientes críticos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia y seguridad de una estrategia de transfusión restringida (ETR) de unidades concentradas de hematíes (UCH), comparándola con una estrategia de transfusión liberal (ETL), en pacientes con hemorragia digestiva aguda y cirrosis.

**Métodos:** Se incluyó a 214 pacientes con cirrosis y hemorragia digestiva aguda y fueron aleatorizados a recibir una estrategia transfusional restringida (N = 109) o liberal (N = 105). Una hemoglobina (Hb) de 70 g/l fue el umbral de transfusión en el grupo de ETR, que recibió UCH para mantenerla de 70 a 80 g/l. En el grupo ETL el umbral para transfundir fue una Hb de 90 g/l, recibiendo UCH para mantenerla de 90 a 100 g/l.

**Resultados:** Las características basales de ambos grupos fueron similares. La causa del sangrado fueron varices esofágicas en el 69% de casos, varices gástricas en 7%, gastropatía en 3% y lesiones pépticas en 15%. Se produjo fracaso terapéutico en 17 pacientes (16%) del grupo ETR vs 29 pacientes (28%) del ETL (p = 0,04). Fallecieron 12 pacientes (11%) del grupo ETR vs 17 (16%) del ETL (p = 0,3). La probabilidad de supervivencia sin fracaso terapéutico a las 6 semanas fue mejor en el grupo ETR que en el grupo ETL (82 vs 69%; p = 0,01). Se registraron efectos secundarios en un 35% de casos del grupo ETR vs 45% del ETL (p = 0,1) y fueron graves en 14 vs 22% respectivamente (p = 0,1). Un 38% de pacientes del grupo de ETR no recibió ninguna transfusión frente al 9% en el ETL (p < 0,001). Al alta, la Hb fue de 92 ± 13 g/l en el grupo ETR vs 101 ± 9 g/l en ETL (p < 0,001), mientras que a las 6 semanas la Hb fue de 113 ± 18 vs 111 ± 15 g/l (p = 0,3). En el subgrupo de pacientes con hemorragia por varices esofágicas, la probabilidad de supervivencia a las 6 semanas sin fracaso terapéutico también fue mejor en el grupo de ETR que en ETL (84 vs 69%; p = 0,02).

**Conclusiones:** En pacientes con cirrosis y hemorragia digestiva aguda, una estrategia transfusional restrictiva, con un umbral de Hb de 70 g / l, disminuye las necesidades de transfusión y la tasa de fracaso terapéutico con respecto a las observadas empleando

una estrategia transfusional liberal. La supervivencia y la incidencia de efectos secundarios son similares con ambas estrategias.

#### PAPEL CRÍTICO DEL COLESTEROL EN LA SUSCEPTIBILIDAD DEL HÍGADO GRASO AL DAÑO POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

L. Llacuna, A. Morales, A. Fernández, J.C. Fernández-Checa y C. García-Ruiz

*Unidad de Hepatología. ICMDiM-Hospital Clínic. CIBEREHD. IIBB-CSIC. IDIBAPS. Barcelona. España.*

**Introducción y objetivo:** El hígado graso es una condición creciente en países industrializados que se caracteriza por un incremento en el depósito de grasa en el hepatocito debido a una mayor lipogénesis de novo y mayor aporte de ácidos grasos del tejido adiposo. La estasis hepática incrementa el daño hepático tras isquemia/repercusión (I/R) y es considerado como un factor primario en el rechazo del injerto en el trasplante hepático. Sin embargo, el papel individual de los distintos componentes lipídicos que caracterizan al hígado graso en el daño por I/R es desconocido. Por tanto, el objetivo de este estudio fue analizar el papel de los triglicéridos (TG), ácidos grasos libres (AGL) y colesterol (COL) en el daño hepático por I/R en modelos nutricionales y genéticos de hígado graso.

**Métodos:** Se realizó I/R parcial durante 90 minutos en ratones salvajes y ob/ob, así como en ratones salvajes alimentados con dieta enriquecida en COL o deficiente en colina. Ratones ob/ob fueron tratados con una dosis diaria de atorvastatina (10 mg/Kg) o YM-53601 (30 mg/Kg), un inhibidor de la escualeno sintasa, durante 1-2 semanas, analizando el daño hepático tras I/R por ALAT/ASAT, H&E y TUNEL.

**Resultados:** Los ratones tratados con la dieta enriquecida en COL mostraron una esteatosis microvesicular caracterizada por un depósito predominante de COL, sin cambios en el nivel de TG/AGL, consistente con resultados previos (Cell Metab, 2006), y una mayor susceptibilidad al daño por I/R comparado con ratones controles. Por el contrario, ratones tratados con dieta deficiente en colina mostraron una esteatosis macrovesicular con depósito mayoritario de TG, y en menor grado de AGL, pero sin cambios en el nivel hepático de COL, cuya sensibilidad al daño por I/R fue similar a la de los ratones tratados con dieta suplementada en colina. Los resultados hallados en los ratones tratados con dieta enriquecida en COL fueron similares a los de los ratones ob/ob en cuanto a la sensibilidad al daño por I/R. Sin embargo, el tratamiento con atorvastatina o YM-53601 previno la susceptibilidad de los ratones ob/ob al daño por I/R medida por ALAT/ASAT, H&E y TUNEL.

**Conclusión:** El acúmulo hepático de colesterol sensibiliza al daño por I/R, surgiendo como una nueva diana terapéutica de relevancia clínica en la prevención del daño por I/R en hígado graso.

#### PAPEL DEL ADN MITOCONDRIAL EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS BILIARES EN CÉLULAS DE HEPATOMA DE RATÓN

M.J. Pérez<sup>a</sup>, A. González-Loyola<sup>b</sup>, R. Rosales<sup>b</sup>, E. Keck<sup>b</sup> y J.J.G. Marín<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca. España.

<sup>b</sup>Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos. Universidad de Salamanca. CIBEREhd. Salamanca. España.

**Antecedentes:** Las mitocondrias, y más concretamente algunos de los genes codificados por el genoma mitocondrial, pueden jugar un papel importante en la toxicidad inducida por compuestos tóxi-

cos en las células hepáticas. Algunos compuestos endógenos potencialmente tóxicos, como los ácidos biliares hidrofóbicos, son capaces de inducir apoptosis en células hepáticas a través del daño de la mitocondria. Sin embargo, la célula posee mecanismos de defensa frente a este proceso como es la inducción de la expresión de proteínas transportadoras de ácidos biliares encargadas de disminuir su acumulación intracelular. La alteración de la función mitocondrial y la actuación de proteínas codificadas por el genoma de este orgánulo podrían intervenir en el mecanismo sensor de distintos estímulos químicos y activador de vías retrógradas de comunicación hacia el núcleo donde se modifica la expresión de genes nucleares.

**Métodos:** Se obtuvo una línea celular de hepatoma de ratón Hepa1-6 parcialmente deficiente de ADN mitocondrial (ADNmt) por tratamiento a largo plazo con 100 ng/ml de bromuro de etidio (células Rho). La disminución de los niveles de ADNmt se comprobó mediante la medida de la relación ARNr 16S/ARNr 18S así como del ADN que los codifica por PCR cuantitativa a tiempo real. Las células se cultivaron en presencia de bajas dosis (25 y 50  $\mu$ M) del ácido biliar glicoquenodesoxicólico (GCDCA) o glicourdosedoxicólico (GU-DCA) a distintos tiempos.

**Resultados:** Las células Hepa1-6 Rho, con niveles de ADNmt tres veces inferiores a los de las células control, presentaron menor nivel basal de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), de porcentaje de células con bajo potencial de membrana mitocondrial (PMM), de tasa de fragmentación del ADN y de muerte tras su análisis por citometría de flujo. En respuesta al GCDCA, en las células control pero no en las Rho, se observó un ligero aumento en la producción de ROS y en el porcentaje de células con bajo PPM a las 5 horas de tratamiento. La proteína transportadora de ácidos biliares Mdr1 pero no Mrp1 y Mrp4 se encontraba sobreexpresada en las células Rho. El aumento en los niveles de ARNm y proteína de Mdr1, Mrp1 y Mrp4 inducido por el GCDCA a las 48 horas en las células control tampoco se observó en las células Rho. Respecto al GU-DCA, no se observó ninguna alteración de los parámetros ensayados en las células control y Rho.

**Conclusiones:** La deficiencia parcial de ADNmt en células de hepatoma de ratón Hepa1-6 resultó en una menor producción de ROS y una menor tasa de células con alteración del PMM en respuesta al GCDCA. También se observó en estas condiciones una falta de regulación de algunas de las proteínas transportadoras de ácidos biliares encargadas de disminuir su acumulación intracelular como Mdr1, Mrp1 y Mrp4.

## PREVENCIÓN DEL SÍNDROME HEPATOPULMONAR TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE QUERCITINA EN RATAS CIRRÓTICAS

M.J. Cuevas<sup>a</sup>, J. Tieppo<sup>b</sup>, R. Vercelino<sup>b</sup>, M.J. Tuñón<sup>a</sup>, N.P. Marroni<sup>b,c</sup> y J. González-Gallego<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD). Instituto de Biomedicina. Universidad de León. León. España.

<sup>b</sup>Laboratorio de Hepatología Experimental y Fisiología. Hospital Clínico de Porto Alegre. Universidad Federal de Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Brasil.

<sup>c</sup>Laboratorio de Estrés Oxidativo. Universidad Luterana de Brasil. Canoas. Brasil.

**Introducción:** El síndrome hepatopulmonar (SHP) se presenta aproximadamente entre el 10-20% de los pacientes con cirrosis. Desde el punto de vista molecular este síndrome se caracteriza por un incremento en la producción de óxido nítrico (NO) y por la sobreexpresión del receptor pulmonar de endotelina B (ETB) y las actividades pulmonares óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y hemooxigenasa 1 (HO-1). No obstante, estos cambios podrían estar influenciados por rutas de

señalización redox, como por ejemplo la que implica al factor nuclear kappaB (NF- $\kappa$ B).

**Objetivos:** Determinar si el tratamiento con el flavonoide querцитina, en ratas sometidas a ligadura del conducto biliar (LCB), disminuye el estrés oxidativo, la activación del NF- $\kappa$ B y la expresión génica de los diferentes mediadores implicados en el SHP.

**Metodología:** Se utilizaron ratas macho de raza Wistar divididas en cuatro grupos experimentales: animales sometidos a LCB, animales control sometidos a estrés quirúrgico, animales control con estrés quirúrgico y tratados con querцитina y animales LCB tratados con el flavonoide. La querцитina (50 mg/kg) se administró durante 2 semanas comenzando el tratamiento 14 días después de la cirugía. Se estudió la producción de NO pulmonar, la activación del factor NF- $\kappa$ B y la expresión génica de eNOS, iNOS, HO-1 y del receptor-ETB mediante PCR cuantitativa a tiempo real (ARNm).

**Resultados:** La ligadura del conducto biliar indujo un incremento en la producción de NO y en los contenidos de ARNm de iNOS, eNOS, HO-1 y del receptor-ETB en comparación con el grupo control. Los incrementos observados se correlacionaron con una activación del NF- $\kappa$ B. En los animales cirróticos tratados con querцитina se observó la inhibición del estrés oxidativo, de la activación del NF- $\kappa$ B y de la expresión de los diferentes genes estudiados.

**Conclusiones:** La administración de querцитina tras un daño hepático establecido mejora significativamente el SHP, al reducir el estrés oxidativo, impedir la activación del NF- $\kappa$ B y disminuir los contenidos de ARNm de iNOS, eNOS, HO-1 y del receptor-ETB, previniendo de esta forma el desarrollo de la enfermedad.

## RADIOEMBOLIZACIÓN HEPÁTICA EN PACIENTES CON HEPATOCARCINOMA Y TROMBOSIS PORTAL

M. Iñarrairaegui<sup>a</sup>, F. Alegre<sup>a</sup>, J.I. Herrero<sup>a,b</sup>, J. Quiroga<sup>a,b</sup>, J. Prieto<sup>a,b</sup> y B. Sangro<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Hepatología. Clínica Universitaria. Pamplona. España.

<sup>b</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas. Pamplona. España.

**Introducción:** La radioembolización con microesferas de Ytrio 90 (90Y-RE) es un tratamiento de tumores hepáticos primarios y metastásicos en el que se utilizan partículas embolizantes de 25 a 40 micras de diámetro como fuentes de radiación beta. Aunque inicialmente la trombosis portal se consideraba una contraindicación a la 90Y-RE por la posibilidad de inducir daño isquémico al disminuir el flujo arterial hepático, se ha demostrado que las microesferas de vidrio pueden utilizarse con seguridad en esta situación clínica. Sin embargo, no se dispone de información al respecto para las microesferas de resina con las que típicamente se emplea un número de partículas 30-40 veces superior.

**Objetivos:** Valorar la seguridad y eficacia de la 90Y-RE en pacientes con hepatocarcinoma (HCC) y trombosis portal.

**Material y métodos:** Se han estudiado retrospectivamente todos los pacientes con HCC y trombosis de la porta principal o sus ramas, tratados mediante 90Y-RE según el protocolo previamente publicado. Los pacientes habían sido seguidos cada 1-2 meses hasta la progresión o el fallecimiento. Para analizar la seguridad se ha estudiado la evolución de los niveles de bilirrubina a los dos meses del tratamiento y la aparición de efectos secundarios relacionados, en especial ascitis y encefalopatía. Para analizar la eficacia se ha estudiado la respuesta tumoral según criterios RECIST y la supervivencia global desde la fecha de tratamiento.

**Resultados:** Se han analizado 15 pacientes con HCC y trombosis portal (de tronco principal en el 26% y de ramas intrahepáticas en el 73% de los casos). Los pacientes eran mayoritariamente cirróticos (86%) y tenían tumores multinodulares (más de 5 nódulos en el

62%) y voluminosos (mediana de volumen tumoral: 784 ml). El tratamiento fue bilobar en el 26% de los casos y la mediana de actividad administrada fue de 1,96 GBq. No hubo diferencias significativas entre la bilirrubina basal y a los 2 meses (medias:  $1,18 \pm 0,56$  mg/dL vs  $1,48 \pm 0,73$  mg/dL, respectivamente). En ninguno de los pacientes se produjo descompensación ascítica, hemorragia varicosa o encefalopatía en los dos meses posteriores al tratamiento. En el 90% de los pacientes evaluables por criterios RECIST se consiguió un control local de las lesiones tratadas como mejor respuesta tu-

moral. La mediana de supervivencia fue de 10 meses (IC 95% 2,0-17,9).

**Conclusiones:** La 90Y-RE es un tratamiento seguro en pacientes con hepatocarcinoma y trombosis portal. La supervivencia alcanzada en este subgrupo de pacientes de mal pronóstico es alentadora cuando se compara con grupos históricos de pacientes no tratados o que recibieron tratamiento con sorafenib. Está justificado el diseño de ensayos clínicos que exploren la eficacia de la 90Y-RE en comparación o en combinación con sorafenib.