

## Fibrogénesis y trasplante hepático

S. Benlloch, B. Beltrán, R. Moreno y M. Berenguer

Servicio de Medicina Digestiva. Hospital La Fe. Valencia. España.

### MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE FIBROGÉNESIS HEPÁTICA

La fibrosis hepática es el resultado del proceso de respuesta biológica ante un daño crónico y una remodelación hepática continua<sup>1</sup>. La consecuencia final de la inflamación y remodelación hepática es la alteración y acumulación de matriz extracelular (ME) que condiciona una distorsión de la arquitectura hepática y formación de una escara fibrótica.

En ese proceso, las células estrelladas hepáticas (CEH) desempeñan un papel predominante<sup>2</sup>. En el hígado sano, estas células se encuentran en estado quiescente, encargándose del almacenaje de los retinoides (vitamina A) en gotas lipídicas de localización citoplasmática. Ante un daño hepático sufren un proceso de activación (transdiferenciación) y adquieren un fenotipo similar al de los miofibroblastos, caracterizado por la expresión de actina  $\alpha$  del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y la pérdida de retinoides<sup>3</sup>. Tras la generación de señales quimiotácticas, tales como citocinas y estrés oxidativo, las CEH activadas proliferan, migran a los lugares donde se ha establecido el daño hepático<sup>4</sup> y se diferencian<sup>5</sup> dando lugar a la producción y remodelación de la matriz extracelular<sup>6</sup> y a la activación de procesos mediados por regulación transcripcional y, consecuentemente, por cambios en la expresión génica<sup>7</sup>. En el proceso de fibrosis también se produce una resistencia intrahepática al flujo sanguíneo con formación de hipertensión portal, en cuyo establecimiento y regulación desempeñan un papel importante las CEH<sup>8</sup>.

### Respuesta de las células estrelladas hepáticas a las citocinas

Varios factores solubles provenientes de diferentes orígenes celulares ejercen acciones biológicas sobre las CEH<sup>1</sup>. Estos factores incluyen citocinas, quimocinas, factores de crecimiento y productos derivados del estrés oxidativo. A su vez, las propias CEH sintetizan y secretan factores solubles que actúan como factores autocrinos. Las distintas citocinas pueden agruparse según el tipo de receptor sobre el que actúan:

1. Receptores tipo factor de crecimiento polipeptídico. Los factores que actúan sobre este receptor promueven la proliferación, migración y supervivencia de las CEH.
2. Receptores para el factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Promueven la acumulación de ME, particularmente el TGF- $\beta$ 1.
3. Receptores de 7 dominios transmembrana. Actúan sobre ellos factores con efecto contráctil sobre las CEH.
4. Receptores para citocinas proinflamatorias.

#### *Receptores tipo factor de crecimiento polipeptídico (RCP)*

De entre todos los factores pertenecientes a esta familia, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), un dímero de dos polipéptidos (A y B), es el más potente de los mitógenos para las CEH<sup>9</sup>. Se ha detectado aumento de este factor, así como del receptor sobre el que actúa, tanto en situaciones de daño hepático agudo como crónico<sup>10,11</sup>. Cuando el PDGF se une al receptor, se pone en marcha una cascada de señalización intracelular que deriva finalmente en la activación de distintas moléculas: *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)<sup>12</sup>, fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3k)<sup>13</sup>, aldehídos reactivos (especialmente 4-hidroxi-2,3-alquenolex)<sup>14</sup>, así como en alteraciones en la concentración de calcio intracelular y del pH<sup>9</sup> (fig. 1).

Correspondencia: Dra. M. Berenguer.  
 Servicio de Medicina Digestiva. Hospital Universitario La Fe.  
 Avda. Campanar, 21. 46009 Valencia. España.  
 Correo electrónico: mbhaym@teleline.es

Recibido el 5-11-2002; aceptado para su publicación el 5-11-2002.

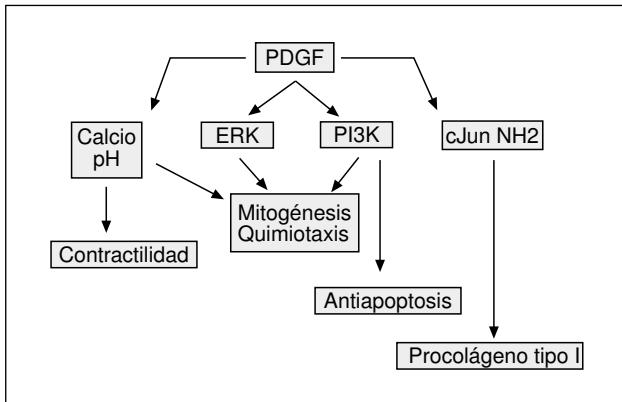


Fig. 1. Mecanismos de activación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Moléculas activadas tras la unión del PDGF a su receptor y efecto fundamental que ejercen. ERK: extracellular signal-regulated kinase; PI-3k: fosfatidil inositol 3-cinasa.

El ERK, una vez activado, se trasloca al núcleo donde induce la fosforilación de algunos factores de transcripción (Elk-1, SAP). Este paso representa un requisito indispensable para obtener una respuesta proliferativa de las CEH. El incremento de ERK se previene siempre que se produce un aumento de cAMP intracelular<sup>15</sup>. La estimulación de CEH con PDGF comporta a su vez un mecanismo de feedback autolimitante para el estímulo mitogénico, consistente en la liberación de PGE-2, la cual induce un aumento del cAMP intracelular<sup>16</sup>.

Otra molécula reclutada por la activación del receptor PDGF es la PI-3k, también necesaria para la inducción de la mitogénesis y de la quimiotaxis<sup>13</sup>. En la actualidad, sólo se conocen parcialmente los efectores activados por la PI-3k, aunque se sabe que incluyen la proteincinasa B (c-Akt) y la ribosomal S6 cinasa<sup>5</sup>. La activación de la PI-3k contribuye también en la regulación de la supervivencia celular al tener una acción antiapoptótica<sup>17</sup>.

La activación del receptor PDGF de las CEH también induce la expresión génica del procolágeno tipo I, a través de la activación y translocación de las cinasas c-Jun NH<sub>2</sub>, aumento de expresión de c-Jun y un incremento de la unión del factor AP-1<sup>14</sup>. Finalmente, el PDGF también señaliza induciendo cambios en la concentración de calcio y de pH. De hecho, el potencial mitogénico del PDGF sobre las CEH activadas humanas es directamente proporcional a sus efectos sobre la concentración de calcio<sup>9</sup>.

Los factores de crecimiento angiogénicos, tales como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF o FGF-2) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), ejercen igualmente efectos importantes sobre las CEH. El bFGF es el segundo factor en potencia mitogénica después del PDGF<sup>18</sup>. Además, diferentes estímulos relevantes durante el daño hepático crónico, tales como la hipoxia, la síntesis de óxido nítrico o el desarrollo de estrés oxidativo, desencadenan un aumento de la expresión del receptor para el VEGF<sup>19</sup>.

### Superfamilia de receptores para el factor-β transformador del crecimiento (TGF-β)

Los pacientes con enfermedad crónica hepática presentan una expresión claramente incrementada de TGF-β<sup>20</sup>. El TGF-β actúa alterando la composición y la producción de ME, al regular el crecimiento celular y la apoptosis. El TGF-β representa el estímulo más potente para la producción de matriz por parte de las CEH. Además, no sólo induce un aumento de producción de la misma, sino que altera su composición<sup>21</sup>.

Aunque existen tres isoformas (β1, β2 y β3) cuya expresión se regula en distintos modos según el tipo celular, todos los estudios se han realizado con la isoforma β1<sup>22</sup>. Los receptores para este factor pertenecen a la superfamilia de las serin-treonincinasas, de la cual existen dos tipos, RI y RII<sup>23</sup>. El TGF-β se une al R-II, lo cual facilita que se reclute el R-I que, a su vez, se fosforila. Este hecho es el responsable de que se inicie una propagación de la señal que termina en la fosforilación de las proteínas Smad -R-Smads (smads 2, 3 y 4), Co-Smads y anti-Smads-. Al fosforilarse éstas, se heterodimerizan y el conjunto migra al núcleo donde inicia y regula la transcripción genética<sup>24</sup>.

### Receptores de varios dominios transmembrana

Estos receptores se suelen subdividir a su vez en dos subgrupos: receptores para factores vasoconstrictores y receptores para quimocinas. A los receptores para factores vasoconstrictores se unen las endotelinas (ET-1, ET-2 y ET-3), la angiotensina II, la vasopresina y la trombina, que, además de ser sustancias constrictoras, promueven acciones profibrogénicas.

Los receptores para endotelinas (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> y ET<sub>C</sub>) se unen a la proteína G y desencadenan una señalización intracelular que lleva a la diferenciación, proliferación e inhibición celulares, y a una variedad de efectos metabólicos<sup>5</sup>. La expresión de endotelina está aumentada en los pacientes con fibrosis hepática<sup>25</sup> y, además, la expresión en el tejido hepático de ET-1 y su receptor se correlaciona con la gravedad de la enfermedad y las complicaciones que aparecen en el paciente cirrótico<sup>26</sup>. Tanto las CEH como las células endoteliales son capaces de sintetizar ET-1<sup>25</sup>, pero, además, en las CEH activadas la síntesis de ET-1 se incrementa por efecto del PDGF, TGF-β, la angiotensina II, los ROS y la propia ET-1. Al mismo tiempo, tras la activación de las CEH se produce un cambio progresivo en la expresión de receptores para endotelina; así, en las fases iniciales de la activación, predomina el receptor ET<sub>A</sub>, y de su estimulación se derivan, en forma dependiente de la dosis, el crecimiento celular, la activación del factor ERK, la expresión de la c-fos, así como un aumento de la concentración intracelular de calcio, con la consiguiente contracción celular<sup>21</sup>. Sin embargo, a medida que progresa la fibrosis se expresa más abundantemente el ET<sub>B</sub>, con lo que el efecto de la ET-1 pasa a ser antiproliferativo<sup>27</sup>. La angiotensina II, implicada en las alteraciones circulatorias típicas de la cirrosis, es un potente vasoconstrictor cuya síntesis está aumentada en esta enfermedad. Sin em-

bargo, esta sustancia también se caracteriza por ejercer efectos biológicos potencialmente relevantes para la progresión de la fibrogénesis hepática, entre los que se incluyen la proliferación e hipertrofia celulares. Las CEH activadas expresan el receptor subtipo AT1, lo cual parece ser una característica de la activación de las CEH<sup>28</sup>. Además, la estimulación con angiotensina II de las CEH comporta un aumento en la concentración de calcio intracelular<sup>29</sup>.

El sistema de quimocinas es un modulador importante de las funciones fisiopatológicas que incluyen la inflamación, la angiogénesis o la migración de leucocitos. Durante la activación de las CEH se secretan varias quimocinas que reclutan células inflamatorias al lugar de la agresión. La quimocina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) induce quimiotaxis, en forma dependiente de la dosis, de las CEH. El efecto de la MCP-1 sobre las CEH comporta un aumento intracelular de calcio y la activación de la PI-3k, necesario para estimular la migración celular. Sin embargo, aún no se ha identificado el receptor sobre el que actúa la MCP-1<sup>30</sup>.

#### *Superfamilia de receptores para el factor de necrosis tumoral (TNF)*

Estos receptores se agrupan en dos subgrupos en función de que presenten o no el denominado «dominio de muerte». Los receptores TNFR1, Fas y p75 pertenecen al grupo que contiene dicho dominio, mientras que otros como el TNFR2 y CD40 carecen del mismo<sup>31</sup>.

El TNF activa cascadas de señalización que regulan la transcripción génica y la inflamación, por una parte, y otras que regulan el proceso de muerte celular (fig. 2). Respecto a las CEH, el TNF participa en el proceso de activación de las mismas<sup>32</sup>. Sin embargo, es un inhibidor de la síntesis de colágeno tipo I y de la proliferación de estas células. Las CEH activadas aumentan también el receptor Fas<sup>33</sup> y el receptor p75<sup>34</sup>, responsables ambos de un aumento paralelo de la apoptosis.

#### *Otros receptores para citocinas*

En la actualidad se está describiendo la acción de muchas otras citocinas cuyo receptor también se expresa en las CEH. Como ejemplos mencionaremos la interleucina 1 (IL-1), citocina de efectos muy similares al TNF, que induce la proliferación de las CEH y la inhibición de la síntesis del procolágeno  $\alpha 1(I)$ , siendo los efectos netos de esta citocina profibrogénicos<sup>25</sup>. Otro ejemplo es el del interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que al unirse a su receptor activa una vía de señalización que concluye en la activación del factor de transcripción STAT1, el cual dimeriza y migra al núcleo, donde regula la transcripción. El efecto final del IFN- $\gamma$  consiste en disminuir la síntesis de ME y la proliferación de las CEH<sup>35</sup>.

#### **Regulación transcripcional en las células estrelladas hepáticas**

La expresión génica se regula de forma exquisita a través de una suma de elementos celulares entre los que se en-

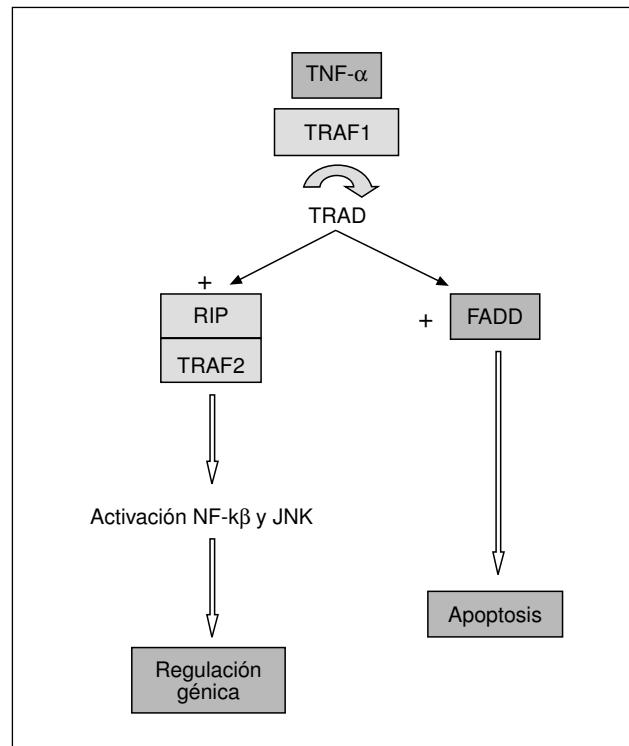


Fig. 2. Mecanismo de acción del factor de necrosis tumoral a (TNF- $\alpha$ ). TRAF1 tiene un papel predominante como mediador de los efectos del TNF- $\alpha$ . Cuando el TNF- $\alpha$  se une, se produce la homotrimerización del TRAF1 y la unión del mismo al TRADD. A partir de este momento pueden activarse dos vías con dos consecuencias totalmente distintas.

cuentran los factores de transcripción. Éstos se localizan generalmente en el citosol y, cuando se activan, adquieren la capacidad de translocarse al núcleo, unirse al ADN y, según la situación celular, actuar simultáneamente como activadores o represores de la expresión génica. El inicio de la transcripción génica requiere mucho más que la simple unión del factor al ADN. La propia maquinaria requerida para la transcripción puede estar limitada en su presencia o capacidad para ser reclutada. Además, existen otros factores denominados «silenciadores» o «aumentadores» a los cuales también pueden unirse los factores de transcripción, que modifican la acción de los mismos sobre la transcripción.

El estrés oxidativo generado en los hepatocitos y en las células inflamatorias es un elemento central en la activación de las CEH. A partir de este momento las CEH son sensibles a estímulos externos, particularmente las citocinas, que pueden regular, mediante la activación de factores de transcripción, la expresión de genes estructurales<sup>1</sup>. En la tabla I se recogen algunos de los factores de transcripción relevantes identificados en las CEH hasta el momento. A continuación se ejemplifica brevemente alguno de los eventos transcripcionales que se han elucidado.

#### *c-myb*

El factor de transcripción c-myb modula la transcripción del gen  $\alpha$ -SMA en las CEH. Recordemos que la expresión

**TABLA I. Factores de transcripción identificados hasta la fecha en las células estrelladas hepáticas<sup>7</sup>**

Factor de transcripción	Actividad celular o gen objetivo
PPAR $\gamma$	Activación, proliferación
RXR	Activación, proliferación
RAR	Activación
C/EBP	$\alpha(1)$ colágeno
c-myb	$\alpha$ -SMA
CR $\acute{E}$ B	Activación, proliferación
KLF-6	Activación
KLF-9	$\alpha(1)$ colágeno
SP1	$\alpha(1)$ colágeno
SP3	$\alpha(1)$ colágeno
STAT	Proliferación
NF-k $\beta$	Efecto dependiente de la concentración (véase texto)
SMADs	Señalización TGF- $\beta$
ETS	Activación
NF1	$\alpha(1)$ colágeno
AP1	TGF- $\beta$ , TIMP-I
AP2	$\alpha(1)$ colágeno

de  $\alpha$ -SMA es característica de estas células cuando están activadas. La expresión de c-myb y la capacidad de unión al ADN están aumentadas en células activadas y no en las quiescentes. Además, la expresión de c-myb puede ser inducida en células quiescentes *in vitro* por estrés oxidativo y se bloquea con antioxidantes<sup>36</sup>. Estos resultados demuestran el importante papel desempeñado por el estrés oxidativo en la activación de la CEH.

#### *C/EBP (CCAATT/enhancer-binding proteins)*

En las CEH el factor de transcripción C/EBP regula la expresión del gen estructural  $\alpha 1$ -colágeno. Cuando el C/EBP se induce por estrés oxidativo, se produce un aumento de la expresión de dicho gen<sup>37</sup>. Sin embargo, cuando se induce por TNF- $\alpha$ , se produce una represión de la expresión del gen  $\alpha 1$ -colágeno<sup>38</sup>.

#### *NFk- $\beta$*

La actividad del factor de transcripción NF-k $\beta$  está incrementada en las CEH activadas. Este nivel basal puede incrementarse aún más cuando las CEH son a su vez estimuladas por citocinas<sup>39</sup>. La actividad transcripcional basal de CEH activadas es permisiva con la expresión del gen  $\alpha 1$ -colágeno y, por tanto, con la fibrogénesis; sin embargo, cuando se sobreestimula la actividad NF-k $\beta$ , se produce una inhibición de dicho gen. El incremento de la actividad NF-k $\beta$  secundario a la estimulación de citocinas tipo TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  determina la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) y moléculas inflamatorias (MIP-2), las cuales desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria que se produce en el proceso de reparación tisular.

#### **Matriz extracelular como regulador de la fibrogénesis hepática**

La ME es una compleja red proteicomolecular donde todos los componentes se organizan de manera precisa para

ofertar a las células un andamiaje estructural a la par que señalizador para la adecuada polarización, migración, proliferación, supervivencia y diferenciación celulares. Las moléculas que conforman la ME son de tres tipos:

- Colágenos, que generalmente se dividen en dos grupos: los colágenos fibrilares y los no fibrilares. Se trata de proteínas con una clara función estructural.
- Proteoglicanos, que se encargan de regular el ensamblaje matricial, estabilizar la arquitectura de la ME y desempeñan un papel importante en la organización espacial de los polímeros estructurales.
- Fibronectina, elastina y fibrilinas. La fibronectina forma fibras *in vivo*, las cuales se estabilizan por puentes disulfuros. La polimerización de la fibronectina es mediada por receptores de superficie celular, especialmente por la integrina  $\alpha 5\beta 1$ <sup>40</sup>.

La ME también contiene factores de crecimiento y metaloproteinasas (MMP) que forman parte activa de los procesos reguladores-responsables de la fibrogénesis. Una característica interesante es el hecho de que algunas moléculas de la ME, como el colágeno XVII y algunos proteoglicanos, contienen un dominio transmembrana que permite su inserción en la membrana plasmática. De esta forma, estas moléculas pueden actuar como transductores directos de señales al interior celular.

En un hígado sano, los hepatocitos están separados del endotelio sinusoidal por el espacio de Disse. Este espacio contiene dos membranas basales, la intersticial y la ME de baja densidad. Esta última es crítica para mantener la funciones diferenciales de las distintas células contenidas en el hígado (hepatocitos, CEH, endotelio sinusoidal y células de Kuppfer). Existe también una ME densa que se localiza fundamentalmente en el área portal, las venas centrales y la cápsula hepática. A medida que el hígado sufre el proceso de fibrogénesis, se producen importantes cambios en la ME, fundamentalmente en los espacios periportal y perisinusoidal. En ellos, el contenido total de los componentes colágenos y no colágenos aumenta un total de 10 veces<sup>40</sup>. La membrana basal perisinusoidal de baja densidad se transforma en una matriz de alta densidad caracterizada por la acumulación de agregados de fibrilla colágena. Este proceso se acompaña de la pérdida de los microvilli de los hepatocitos y de la desaparición de las fenestraciones endoteliales. Estos cambios comprometen seriamente la función hepática y contribuyen a la activación de las CEH y los miofibroblastos<sup>42</sup>. Cuando estas células se activan, aumenta su capacidad de producir un amplio espectro de moléculas de la ME, con lo que contribuyen a generar la matriz fibrótica tanto cuantitativa como cualitativamente. Estas células también secretan las MMP y sus inhibidores (TIMP-1 y TIMP-2). La capacidad que tienen las CEH de aumentar la producción de MMP abre un posible camino terapéutico para resolver la cicatrización fibrótica.

Como ya se ha apuntado anteriormente, algunos componentes de la ME pueden transmitir señales a las células a través de receptores transmembrana. Estos sensores son fundamentalmente las integrinas y los proteoglicanos

transmembrana. De la interacción de algunos componentes de la ME con ellos surge parte del control de la adhesión, diferenciación, migración, proliferación o apoptosis celulares. Además, las integrinas funcionan como mecanorreceptores que aportan la comunicación física para la transmisión de fuerzas entre la ME y el citosqueleto celular<sup>42</sup>. A su vez, gracias a este tipo de interacción, la propia ME cumple un importante papel en el control de su propia síntesis y degradación por parte de las CEH y los miofibroblastos activados. Esta regulación ocurre de forma orquestada con las señalizaciones ejercidas por otros factores, tales como citocinas y factores de crecimiento expuestos en un apartado previo. De este modo, existe un ecosistema, potencialmente vulnerable, donde la síntesis-degradación de la ME se deriva del compendio de señales provenientes de todos los factores implicados.

#### **Regulación del flujo sanguíneo hepático por las células estrelladas hepáticas**

Las células endoteliales y CEH localizadas en el sinusoides hepático desempeñan un papel predominante en la regulación del flujo sanguíneo hepático. Las CEH son capaces, por su capacidad contráctil, de regular la resistencia sinusoidal al flujo sanguíneo. El grado de contractilidad basal de la CEH en el hígado sano es aún motivo de controversia. Sin embargo, las CEH activadas presentan un claro aumento de su capacidad contráctil, siendo además el grado de contracción proporcional al de activación<sup>43</sup>. En el hígado dañado, este aumento de contractilidad supone una incremento de la resistencia sinusoidal que contribuye al desarrollo de hipertensión portal. Consecuentemente, la regulación de la contractilidad de las CEH representa un potencial objetivo terapéutico.

#### *Moduladores vasoactivos de la capacidad contráctil de las células estrelladas hepáticas*

En la tabla II se recogen varios compuestos con capacidad reguladora de la contractilidad de las CEH. De entre ellos, las endotelinas son los inductores más potentes de la contractilidad de las CEH. Por otra parte, el óxido nítrico (NO) se ha perfilado como un elemento fundamental en la regulación de la contractilidad por su capacidad relajante de las CEH<sup>44</sup>. De este modo, la interrelación entre endotelinas y NO determina el flujo sanguíneo sinusoidal.

**Endotelinas.** Se trata de una familia de potentes vasoconstrictores que engloba las tres endotelinas ET-1, ET-2 y ET-3, cuyo papel fundamental es la regulación del flujo sanguíneo local. Los pacientes con cirrosis presentan concentraciones circulantes de ET-1 y ET-3 incrementadas y, además, en modelos experimentales de daño hepático se ha observado que la producción de endotelinas aumenta<sup>45</sup>. En el hígado sano, la ET-1 se produce en las células endoteliales. Sin embargo, en un contexto de daño hepático pasa a ser producida por las CEH. Los receptores para endotelinas, aunque detectables en distintos tipos celulares

**TABLA II. Agentes con efecto sobre la contractilidad de las células estrelladas hepáticas<sup>8</sup>**

Contracción	Relajación
Endotelinas (1, 2, 3)	Óxido nítrico
Angiotensina 2	Monóxido de carbono
Trombina	PGE2
Vasopresina	Lipo-PGE1
Sustancia P	Andrenomedulina
PAF	
Adenosina	
Tromboxano A2	
Prostaglandina F2	
Suero	

del hígado, se encuentran en mayor concentración en las CEH, donde sufren un aumento de expresión tras un infarto hepático<sup>23</sup>. El aumento de endotelinas que se produce durante el proceso de daño hepático induce un aumento de contractilidad de las CEH, con el consiguiente aumento de contracción sinusoidal y, por tanto, de resistencia al flujo sanguíneo.

**Óxido nítrico.** El NO es una molécula que, entre otras funciones, media la relajación vascular<sup>46</sup>. Diversos estudios han demostrado que desempeña un papel fundamental en el hígado enfermo. En esta situación, si bien la cantidad de enzima encargada de su síntesis (NO sintasa) no se ve alterada, la cantidad de NO producido está disminuida<sup>47</sup>. Esta disminución no sólo implica una mayor contracción vascular por déficit del componente vasodilatador, sino que determina una mayor contracción de las CEH. Un estudio experimental reciente demuestra que, en modelos de cirrosis y de hipertensión portal, la transfección de hígados con adenovirus recombinante para la isoforma neuronal de la NOS consigue disminuir la resistencia intrahepática al flujo y la presión portal<sup>48</sup>.

#### **FIBROGÉNESIS EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO**

En las fases iniciales, la formación de fibrosis en el hígado puede tener una distribución focal y limitada. En las fases más avanzadas del daño, la fibrosis se deposita formando bandas que unen los espacios porta entre sí, rodeando islotes de células hepáticas y modificando la estructura normal del hígado hasta el establecimiento de cirrosis. No debe confundirse el término fibrosis con cirrosis, ya que este último se considera un estadio avanzado de la fibrogénesis en el hígado.

Existen múltiples enfermedades que promueven la formación de fibrosis y cirrosis en el hígado, y la posterior necesidad de un trasplante hepático. Las más frecuentes son la infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) y el alcoholismo<sup>49</sup>. Existen otras causas que comparten en su evolución o en su estadio final la presencia de fibrosis, como la hepatitis autoinmune, las enfermedades colestásicas tales como la cirrosis biliar primaria y la colangitis esclerosante primaria, la cirrosis secundaria a la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, las enfermedades con alteraciones metabólicas, los fármacos y algunas toxinas, etc. (tabla III). Por la gran variedad de enfermedades que

**TABLA III. Enfermedades susceptibles de trasplante hepático**

Hepatopatía crónica
Cirrosis por virus C o B
Cirrosis alcohólica
Cirrosis autoinmune
Enfermedades colestásicas
Cirrosis biliar primaria
Colangitis esclerosante primaria
Cirrosis secundaria a hemocromatosis
Insuficiencia hepática aguda grave
De origen viral
Tóxicos
Enfermedad de Wilson
Vasculares
Síndrome de Reye
Tumores hepáticos
Hepatocarcinoma y su variante fibrolamelar
Enfermedades metabólicas de origen hepático
Enfermedad de Wilson
Déficit de alfa-1-antitripsina
Amiloidosis portuguesa
Hipercolesterolemia familiar homocigota
Tirosinemia
Glucogenosis tipos I y IV
Síndrome de Crigler-Najjar tipo I
Déficit del ciclo de la urea
Hemofilia A y B
Déficit de proteínas C y S
Enfermedades vasculares hepáticas
Síndrome de Budd-Chiari
Enfermedad venooclusiva
Otras
Poliquistosis
Enfermedades congénitas
Atresia biliar
Síndromes colestásicos familiares
Fibrosis hepática congénita
Enfermedad de Caroli
Fracaso de un injerto previo
Fallo primario del injerto
Problemas técnicos
Rechazo
Recidiva de la enfermedad primaria

pueden causar fibrosis en el hígado, se concluye que la formación de este material es el resultado de una serie de pasos que, aunque se desencadenan inicialmente como respuesta a una agresión específica, con posterioridad se suceden de forma independiente a la enfermedad que inició el daño.

No existen por ahora tratamientos efectivos que logren revertir el proceso de la cirrosis y sus complicaciones, por lo que el trasplante hepático es el tratamiento de elección en los pacientes con enfermedades hepáticas en fase terminal. Hoy día es un procedimiento habitual con el que se logra una supervivencia en torno al 65- 80% en el primer año. Esta modalidad de tratamiento, no obstante, no modifica la enfermedad de base, ya que, si bien interviene en las complicaciones producidas por la enfermedad, en general no impide que la noxa que desencadenó la formación y el desarrollo de la fibrosis en el hígado original lo haga también en el hígado injertado. En este sentido, la recurrencia de la enfermedad de base es una de las complicaciones más frecuentes tras el trasplante hepático. Ocurre prácticamente con todas las enfermedades, salvo con aquellas adquiridas no virales, tales como el alcoholismo, el daño por fármacos y las toxinas, siempre y cuando estas noxas no estén presentes en el postrasplante. La recurrencia de la enfermedad en el injerto representa

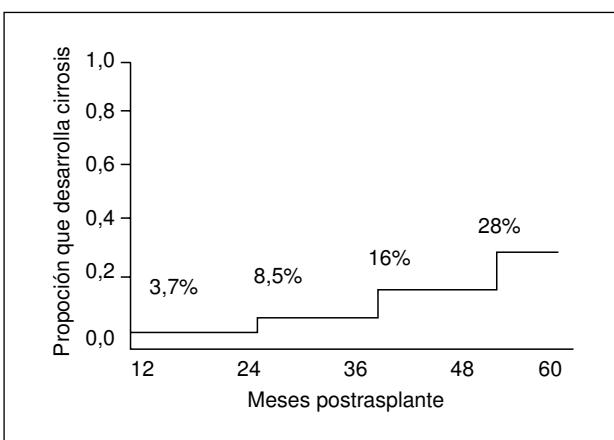


Fig. 3. Probabilidad acumulada de desarrollar una cirrosis del injerto por recurrencia de la infección por el virus de la hepatitis C. (Tomada de Prieto et al<sup>53</sup>.)

un modelo de estudio capaz de reproducir los mecanismos que intervienen en la fisiopatogenia de la enfermedad y, por tanto, también en la fibrogénesis hepática.

#### Recurrencia de las enfermedades de origen viral

La recurrencia de la enfermedad en el injerto es un hecho que está claramente demostrado en el caso de los virus de la hepatitis B y C, precediendo siempre a la formación de fibrosis la existencia de actividad necroinflamatoria. La reinfección del VHC es prácticamente universal y, por el momento, inevitable, con posterior desarrollo de hepatitis crónica en la gran mayoría de los pacientes<sup>50-54</sup>. De éstos, cerca de las dos terceras partes acaban desarrollando una fibrosis importante en el transcurso de los primeros 10 años postrasplante. En un estudio reciente se estimó que la probabilidad acumulada de desarrollar una cirrosis del injerto por el VHC pasaba del 3,7% al año al 28% a los 5 años de seguimiento. Estos hallazgos reflejan la elevada agresividad de la hepatitis C en el trasplante hepático frente a lo descrito en pacientes inmunocompetentes. La demostración de esta hipótesis proviene de un estudio multicéntrico que comparó la progresión después y antes del trasplante en una cohorte de 284 pacientes<sup>55</sup>. La tasa de progresión de la fibrosis fue significativamente mayor después que antes del trasplante, lo cual se traduce en un menor tiempo requerido para el desarrollo de cirrosis<sup>54-57</sup> (fig. 3). A partir de la tasa de progresión de fibrosis, se pudo estimar que este tiempo tenía una mediana de 9-12 años en el transplantado<sup>55</sup>, duración significativamente menor a la descrita en el paciente inmunocompetente, en el cual la historia natural de la infección por el VHC se mide en décadas.

Esta mayor agresividad en la historia natural de la hepatitis C no solamente ocurre en la fase precirrótica, sino igualmente tras el desarrollo de cirrosis del injerto, con una tasa de descompensación clínica muy alta tras períodos cortos de seguimiento. En un estudio reciente, la pro-

babilidad de descompensación clínica de un trasplantado con cirrosis VHC fue del 42% al mes del diagnóstico de cirrosis del injerto, tasa significativamente mayor a la observada en pacientes cirróticos no transplantados (5-8% en este mismo período)<sup>57</sup>.

Existen estudios recientes que han demostrado que la historia natural de la hepatitis C recurrente está empeorando en los pacientes transplantados más recientemente<sup>54,58</sup>. Con todos estos datos, no es de extrañar que en varios centros estemos asistiendo a un descenso de la supervivencia de los pacientes infectados por el VHC respecto a los no infectados<sup>58,59</sup>, e incluso a una caída de la supervivencia entre los transplantados más recientemente infectados por el VHC<sup>58</sup>.

Es importante mencionar que, en los transplantados, los marcadores bioquímicos tradicionales de daño hepático, y más concretamente las aminotransferasas, son pobres indicadores de este daño, por lo que en muchos de los casos se subestima la recurrencia de la enfermedad y, por tanto, el desarrollo de la fibrosis<sup>60</sup>. Aunque se han descrito otros marcadores séricos de formación de fibrosis, como la determinación de la metaloproteinasa 1, su inhibidor tisular y el propéptido de la procolágena III, la biopsia hepática continúa siendo el instrumento más preciso en la evaluación de la recurrencia de la enfermedad de base<sup>58,60</sup>.

Estudios experimentales previos han demostrado que las CEH desempeñan un papel importante en las hepatitis virales. En injertos con recurrencia de la hepatitis por el virus C se ha detectado una gran expresión de esta clase de células. En un estudio de biopsias de la fase aguda de la hepatitis, el isotipo alfa de la actina, un marcador fenotípico de las células del músculo liso, se detectó en gran cantidad y se correlacionó con una evolución desfavorable hacia la cirrosis<sup>61</sup>, lo que refleja una temprana activación de las células estrelladas a miofibroblastos.

La historia natural de la hepatitis C recurrente es, sin embargo, variable, y mientras un tercio evoluciona hacia la cirrosis en los primeros 5 años, otro tercio continúa estable tras este período<sup>60</sup>. Existen varios factores involucrados en esta variabilidad, entre los que destacan la inmunosupresión, los factores dependientes del virus y el donante<sup>52-60,62</sup> (tabla IV). En este sentido, el potencial perfil de un paciente con riesgo de desarrollar de forma rápida una cirrosis del injerto sería un paciente transplantado en los últimos años, infectado por el genotipo 1b, que recibe un órgano de un donante mayor de 45 años, con alta carga de viremia en el pre y/o postrasplante inmediato, cuya inmunosupresión inicial se basa en una combinación de fármacos potentes con una rápida retirada de los considerados de segunda línea, que desarrolla una infección por citomegalovirus, tratado por episodios de rechazo con un número elevado de bolos de metilprednisolona o con preparaciones antilinfocíticas, y que desarrolla una hepatitis histológica de forma temprana (en los primeros 6 meses) y con signos de gravedad histológica. Hoy por hoy, no existen medidas profilácticas similares a las descritas en el virus de la hepatitis B (VHB), y las alternativas terapéuticas son escasas (interferón y ribavirina) y poco eficaces. Pueden administrarse en el pretrasplante,

**TABLA IV. Variables predictivas de progresión histológica o gravedad de la hepatitis C recurrente**

Variables	Asociación
Del virus	
Fenotipo	1b
Carga viral pre-LT	Positiva (0,5-1 MEq/ml)
Carga viral al 4 mes	Positiva (> 10 MEq/ml)
Del donante	
Edad	Positiva (> 45-50 años)
Sexo	Positiva (peor en mujer)
Histológicas	
Grado de actividad en la biopsias iniciales	Positiva (hepatitis autoinmune > 3 al cuarto mes, > 8 al año)
Hallazgos específicos	Esteatosis, colestasis, degeneración hepatocitaria
Preocurrencia de la recurrencia histológica	Peor si es en los primeros 6 meses
Inmunosupresión	
Bolos de metilprednisolona	Positiva
Preparados antilinfocíticos (OKT3, etc.)	Positiva
Tipo de inducción	(?)
Del huésped	
Raza	(?)
HLA	(?)
De la intervención	
Tiempo isquemia caliente	Positiva (> 70 min)
Tiempo isquemia fría	Sin asociación
Otras	
Año del trasplante	Positiva (> 1995)
Anti-HVC core IgM Ab	Positiva (al mes postrasplante)
Infección con citomegalovirus	Positiva
Coinfección con el VHB	(?)
Coinfección con el VHg	Sin asociación
Progresión pretrasplante	Sin asociación
Carcinoma hepatocelular	(?)

en cuyo caso tienen el riesgo de precipitar el fallo hepático o complicarse con infecciones o citopenias muy graves. Su administración temprana postrasplante está limitada por la dificultad en administrar estos fármacos en este período, debido a la alta inmunosupresión y citopenias ya existentes. La mejor medida parece ser la del tratamiento de la enfermedad establecida en su fase crónica (véase el apartado «Fibrogénesis hepática. Aspectos terapéuticos»). La respuesta sostenida se sitúa en torno al 10-30%, y es peor si el genotipo infectante es el 1. En caso de fallo del injerto, se puede plantear un retrasplante, clásicamente asociado con malos resultados. Si se opta por el retrasplante, se debe tomar cierto tipo de medidas para evitar la elevada mortalidad postoperatoria y mejorar el pronóstico a largo plazo, tales como retrasplantar a estos pacientes antes del desarrollo de complicaciones renales e infecciosas, e idealmente incluirlos en ensayos que valoren el papel de la terapia antivírica profiláctica.

La recurrencia de la infección por el virus B, en ausencia de profilaxis, se asocia con una alta tasa de pérdida del injerto y mortalidad elevada (85-95% de los casos)<sup>63</sup>. En ocasiones, la reinfección puede condicionar un curso fulminante a las pocas semanas de la hepatitis. El riesgo de la reinfección se asocia con el estado serológico y virológico del VHB en el momento del trasplante, siendo bajo en pacientes transplantados por hepatitis fulminante o infectados con el virus delta (20%), moderado en caso de hepatopatía crónica sin marcadores de replicación viral

y máximo cuando los marcadores de replicación (ADN-VHB y/o HBeAg) están presentes. Habitualmente, y después de la reaparición del antígeno de superficie del virus B (HBsAg) en el suero, entre el primer y el sexto mes tras el trasplante, la mayoría de los pacientes presentan un episodio de hepatitis aguda que suele evolucionar de forma invariable y rápida hacia la cronicidad, de modo que puede aparecer cirrosis en el injerto en un período de 12 meses tras el trasplante<sup>63</sup>. De forma similar a lo que sucede en la hepatitis C, se ha observado en estudios anatomo-patológicos que la activación de las CEH es uno de los pasos iniciales y tempranos en la formación de fibrosis hepática<sup>64</sup>.

En la reinfección del injerto por el virus B existe un síndrome que se caracteriza, clínicamente, por una evolución rápida hacia la insuficiencia hepatocelular con ictericia pronunciada; histológicamente por fibrosis, colestasis importante y escaso infiltrado inflamatorio, e inmunohistochimicamente por la presencia difusa e intensa de HBsAg citoplasmático asociado a la presencia del antígeno *core* nuclear y citoplasmático. Esta entidad, denominada hepatitis fibrosante colestásica, no se observa fuera del ámbito del trasplante<sup>65</sup>, por lo que se ha planteado que está relacionada con un daño citopático directo debido a cantidades masivas del virus B, promovidos en parte por el tratamiento inmunosupresor.

La recurrencia de enfermedades con posible base autoinmune, tales como la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria y la hepatitis autoinmune, es menos evidente que en las enfermedades virales<sup>66</sup>. La supervivencia obtenida tras el trasplante en pacientes con cualquiera de estas enfermedades es excelente y alcanza cifras en torno al 80-90% a los 5 años. Durante tiempo se ha debatido sobre la posibilidad de recurrencia de estas enfermedades. El problema radica en la dificultad del diagnóstico de recurrencia, ya que existen varias condiciones del postrasplante capaces de producir las mismas alteraciones analíticas, radiológicas e incluso histológicas, que deben excluirse minuciosamente. Otros problemas añadidos son la ausencia de marcadores específicos de estas enfermedades y la recurrencia o persistencia frecuente de los marcadores de autoinmunidad. Pese a las dudas iniciales respecto a la recurrencia de la cirrosis biliar primaria, hoy por hoy parece claramente demostrado que la cirrosis biliar primaria puede recurrir sobre el injerto, pero con escasa frecuencia (20% a los 5 años)<sup>66</sup>. El diagnóstico es difícil y requiere la exclusión de otras condiciones que remedian esta enfermedad, tales como el rechazo agudo o crónico, las hepatitis de origen viral, la obstrucción del conducto biliar, el daño por fármacos y la enfermedad de injerto contra el huésped. La presencia de colangitis granulomatosa destructiva en la biopsia confirma el diagnóstico de recurrencia de la enfermedad.

El diagnóstico de recurrencia de la colangitis esclerosante primaria es difícil de realizar, ya que se carece de criterios exactos de diagnóstico y es preciso descartar toda aquella enfermedad capaz de provocar estenosis no anastomóticas del árbol biliar, incluyendo el daño de preservación del injerto, la incompatibilidad de grupo ABO en-

tre el donante y el receptor, el rechazo crónico, la estenosis de la arteria hepática y la infección viral. Además, debe haber hallazgos histológicos y colangiográficos compatibles con esta enfermedad. Utilizando criterios muy estrictos, se considera que la recurrencia ocurre en un 20% de los casos en los primeros 5 años<sup>66</sup>.

La recidiva de la hepatitis autoinmune ocurre en un 2-49% de los casos. El diagnóstico se basa en criterios clínicos, serológicos e histológicos, así como en la exclusión de otras causas; no suele condicionar problemas clínicos y la supervivencia del paciente y del injerto es en general buena<sup>66</sup>.

En resumen, con los datos de que se dispone en la actualidad, parece que la recidiva de la colangitis esclerosante primaria, la cirrosis biliar primaria y la hepatitis autoinmune suele progresar de forma relativamente lenta sin condicionar un acortamiento de la supervivencia<sup>66</sup>.

En conclusión: *a)* los mecanismos implicados en la formación de fibrosis en el injerto hepático pueden ser los mismos que en la enfermedad original; *b)* los índices de formación de material de fibrosis se detectan tempranamente en la recurrencia de la enfermedad viral; *c)* existen algunos marcadores bioquímicos séricos útiles en la evaluación de la fibrogénesis, y *d)* la progresión de fibrosis en los pacientes trasplantados por enfermedades de posible etiología autoinmune es característicamente más lenta y con mejor pronóstico que en las enfermedades de causa viral.

## FIBROGÉNESIS HEPÁTICA. ASPECTOS TERAPÉUTICOS

Los progresos realizados en los últimos años en el conocimiento de los mecanismos de fibrogénesis abren las puertas a nuevas terapias potencialmente efectivas. El fármaco ideal debería ser de liberación fácil en el organismo, bien tolerado y con especificidad por el hígado. El objetivo del tratamiento no es abolir cualquier proceso de fibrogénesis, sino más bien impedir su progresión para que el paciente con hepatopatía crónica no presente complicaciones derivadas de la hipertensión portal.

La mejor forma de prevenir la progresión de la fibrosis hepática es, indudablemente, eliminar el estímulo inicial que la desencadenó; instaurando esta medida de forma precoz, la fibrosis puede incluso revertir. Así, la abstinencia enólica, la discontinuación del fármaco o toxina causante del daño hepático, el tratamiento antihelmíntico en la esquistosomiasis, la descompresión biliar en caso de obstrucción biliar, el tratamiento de enfermedades de depósito de hierro y cobre o el de enfermedades autoinmunes y el tratamiento antiviral en las hepatopatías por virus de la hepatitis B y C son medidas efectivas en la disminución de la fibrosis hepática, como se refleja en varias revisiones recientes sobre el tema<sup>67</sup>.

Sin embargo, la abolición total de la causa de la enfermedad no siempre es posible, sobre todo en lo que concierne a la hepatopatía por el VHC. Por ello, se han diseñado aproximaciones terapéuticas encaminadas a intentar controlar la inflamación (como precursora de la fibrosis) o a

**TABLA V. Potenciales fármacos antifibróticos**

Efecto	Fármaco o sustancia	Mecanismo de acción	Eficacia antifibrótica	
			Animal	Humano
Antiinflamatorio	Corticoides	Inhiben la síntesis de colágeno	No	Sí (?)
	Prostaglandinas	Inhiben la síntesis de colágeno	Sí	No estudiado
	Colchicina	Frena la migración de células inflamatorias	Sí	No
	Malotilato	Inhibe la síntesis de colágeno	Sí	No
	IL-10	Citocina antiinflamatoria	Sí	Sí
	Octreótido		Sí	No estudiado
	AUDC	Anticolestásico y antiinflamatorio	Sí	Sí (?)
	<i>Thielavia minor</i>	Inhibe la producción de colágeno y fibronectina	Cultivo	No estudiado
Interferencia en la activación, proliferación o interacción de las CEH	Vitamina E	Antioxidante. Inhibe la activación de CEH	Sí	No
	Silimarina	Antioxidante. Inhibe la activación de CEH	Sí	Sí
	Fosfatidilcolina	Antioxidante. Inhibe la activación y proliferación de CEH	Sí	(?)
	SAME	Antioxidante. Inhibe la activación de CEH	Sí	(?)
	Receptores solubles del TGF-β	Antagonizan TGF-β	Sí	No estudiado
	HGF	Regeneración de hepatocitos	Sí	No estudiado
	IFN-γ	Inhibe la activación de CEH	Sí	Sí
	IFN-α	Inhibe la activación de CEH + síntesis colágeno + ↑ degradación	Sí	Sí
	Pentoxifilina	Inhibe PDGF y TGF-β	Sí	No estudiado
	Simvastatina	Inhibe la activación de CEH	Sí	No estudiado
Disminución síntesis MEC	Rapamicina	Inhibe la proliferación de CEH	Sí	No estudiado
	Esfingosina	Inhibe la proliferación de CEH	Sí	No estudiado
	Estradiol	Inhibe la activación de CEH	Sí	No estudiado
	Irbesartán, candesartán	Antagonistas AG-II	Sí	No estudiado
	Antagonistas endotelina	Antagonistas receptores ET-1a	Sí	No estudiado
	Prazosín	Antagonista adrenérgico	Sí	No estudiado
	Nitroglicerina	Donador de NO	Cultivo	No estudiado
	Ácidos grasos saturados	(?)	Sí	No estudiado
	<i>Sho-saiko-to</i>	Inhibe la activación y proliferación de CEH	Sí	No estudiado
	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Inhibe TGF-β y la síntesis de colágeno	Sí	No estudiado
Estímulo degradación MEC	Glicirricina	Inhibe el factor nuclear kappa-B	Sí	Sí (?)
	S-4682	Inhibe la prolil-4-hidroxilasa	Sí	No estudiado
	HOE 077	Inhibe la prolil-4-hidroxilasa y la activación de CEH	Sí	No estudiado
	Halofuginona	Inhibe la expresión de genes de colágeno (↓ síntesis colágeno)	Sí	No estudiado
Estímulo degradación MEC	Adenosina	Acelera la colagenólisis	Sí	No estudiado
	uPA	Aumenta la colagenasa	Sí	No estudiado

AUDC: ácido ursodesoxicólico; CEH: células estrelladas hepáticas; MEC: matriz extracelular; SAMe: S-adenosilmetionina; TGF: factor de crecimiento transformador (*transforming growth factor*); HGF: factor de crecimiento hepatocitario (*hepatic growth factor*); AG-II: angiotensina II; IL: interleucina; IFN: interferón. Si (?): no existen datos definitivos/studios contradictorios.

interrumpir el proceso de fibrogénesis en alguna de sus sucesivas etapas. Así, se podrían esquematizar las estrategias terapéuticas actuales como sigue:

1. Disminuir la inflamación hepática.
  2. Inhibir la activación y proliferación de las CEH o su interacción con el medio.
  3. Disminuir la síntesis de matriz extracelular.
  4. Favorecer la degradación de matriz extracelular.

La mayoría de los fármacos y sustancias que se van a exponer a continuación han sido sólo estudiados en células en cultivo y en modelos experimentales de fibrosis hepática en la rata o en el babuino (tabla V). Son necesarios más estudios en humanos, algunos ya en curso, para identificar los fármacos útiles y aplicables a la práctica clínica.

#### **Disminución de la inflamación hepática**

La inflamación hepática es el principal estímulo para la fibrosis. Entre los fármacos que se han ensayado para re-

ducirla figuran: corticoides, prostaglandinas, colchicina, malolitato, citocinas, octreótido, ácido ursodesoxicólico y productos derivados del hongo *Thielavia minor*.

Los corticoides se utilizan con éxito en varias hepatopatías debido a su gran potencia antiinflamatoria. Inhiben la síntesis de colágeno a distintos niveles (transcripción genética, aumentan la inestabilidad del ARNm-colágeno, disminuyen la actividad de enzimas como la prolilhidroxilasa y lisilhidroxilasa, etc.) y reducen la inflamación a través de la interacción con citocinas. El empleo de los corticoides en la hepatitis autoinmune ha logrado una mejoría clínica, analítica e histológica; no obstante, la supresión de la fibrogénesis no siempre es completa<sup>68,69</sup>.

La prostaglandina E ejerce un efecto antifibrosante en modelos experimentales de fibrosis<sup>70</sup>, pero no contamos con experiencia en humanos.

La colchicina, un alcaloide derivado de la planta *Colchicum autumnale*, tiene efecto analgésico, antimitótico y, en el caso de la gota, antiinflamatorio debido a su capacidad de unirse a los microtúbulos e impedir los procesos en que intervienen (formación del huso mitótico, diapédesis, migración de gránulos intracelulares y qui-

miotaxis de neutrófilos y fagocitos). Recientemente se ha publicado un metaanálisis sobre la eficacia de la colchicina en la fibrosis hepática y la cirrosis<sup>71</sup> en el que se combinaron los resultados de 14 ensayos clínicos que incluyeron a un total de 1138 pacientes; no se demostró mejoría significativa en la mortalidad, complicaciones, marcadores séricos de fibrosis hepática ni en la histología. Por lo tanto, no debe ser indicada para tratar la fibrosis hepática o cirrosis independientemente de su etiología. Estos resultados negativos también se han confirmado para la cirrosis alcohólica<sup>72</sup>.

El malitolato es un agente antiinflamatorio hepatoprotector que reduce la fibrogénesis en ratas con daño hepático inducido por tetracloruro de carbono mediante la inhibición de la expresión del citocromo P450. En humanos no se ha observado un claro beneficio<sup>67</sup>.

El desequilibrio existente entre citocinas proinflamatorias y citocinas antiinflamatorias, con predominio de las primeras sobre las segundas, en los casos de daño hepático se ha convertido en otra diana de actuación a la hora de idear estrategias antifibróticas. La neutralización de la IL-1, una citocina proinflamatoria, con antagonistas de su receptor tuvo un modesto beneficio en ratas con hepatopatía inducida por dimetilnitrosamina<sup>67</sup>. Por otra parte, se ha observado en modelos murinos un exceso de IL-13; de hecho, el bloqueo de la IL-13 en ratas con esquistosomiasis se tradujo en una disminución de la fibrosis hepática<sup>73</sup>. En lo referente a citocinas antiinflamatorias, la IL-10 tiene capacidad para disminuir la producción de citocinas proinflamatorias tales como el TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 e IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T. Además, se ha observado que el hígado cirrótico es deficiente en IL-10<sup>74</sup>. Un reciente ensayo clínico ha demostrado que la administración de IL-10 recombinante humana diariamente durante tres meses reduce la fibrosis en pacientes con hepatitis C que no responden al interferón<sup>75</sup>. Actualmente se está investigando la seguridad y eficacia del tratamiento con esta citocina a largo plazo.

Tanto el octreótido como el ácido ursodesoxicólico (AUDC) han mostrado eficacia antifibrótica en ratas<sup>66</sup>. En humanos se ha realizado un metaanálisis sobre el efecto del AUDC en pacientes con cirrosis biliar primaria. A pesar de que mejoraron los síntomas y los hallazgos de laboratorio, no se modificaron la histología, la mortalidad ni la necesidad de trasplante hepático<sup>76</sup>.

El OPC-15161, un componente del hongo *T. minor*, inhibe la producción de hidroxiprolina en cultivos de células estrelladas de rata; en otros tejidos posee propiedades antioxidantes e impide la producción de colágeno tipo I y fibronectina<sup>67</sup>. No se ha investigado su aplicabilidad clínica en el humano.

### Inhibición de la activación, proliferación e interacción de las células estrelladas hepáticas

Dado que las CEH desempeñan un papel de capital importancia en el proceso de fibrogénesis hepática, muchas de las terapias antifibróticas que están actualmente en es-

tudio van dirigidas a inhibir su activación, su proliferación o los productos que sintetizan (citocinas, colágeno, entre otras). En la activación de estas células participan mediadores como citocinas y sus receptores, especies reactivas de oxígeno y otras señales paracrinas y autocrinas, como se ha expuesto en el primer apartado. Por tanto, los esfuerzos para disminuir la activación de las CEH deben comenzar por interaccionar de alguna forma con estos mediadores. Los antioxidantes son una opción atractiva. No sólo inhiben la activación de la célula estrellada, sino que también impiden la activación de las células de Kupffer y previenen la apoptosis de los hepatocitos. El  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) se ha ensayado con éxito en ratas<sup>66</sup>; en humanos bloquea los signos histológicos del estrés oxidativo en pacientes con hepatitis crónica C, pero no tiene efecto sobre la fibrosis o la inflamación<sup>77</sup>. La silymarina y su principio activo, la silybinina, es un flavonoid que reduce en un 30% el depósito de colágeno en ratas con fibrosis biliar secundaria, además de ejercer un efecto inhibidor sobre las células de Kupffer<sup>2</sup>. En humanos, un ensayo clínico multicéntrico ha observado cierto efecto positivo en pacientes con cirrosis alcohólica<sup>78</sup>.

La fosfatidilcolina, componente activo de la lecitina poliinsaturada, se ha estudiado como agente antifibrogénico debido a su capacidad para reducir la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico multicéntrico en pacientes con enfermedad hepática alcohólica.

La S-adenosil-L-metionina (SAMe), utilizada en hepatopatías con colostasis intrahepática, atenúa la fibrosis hepática en modelos experimentales; en pacientes con cirrosis alcohólica mejora la supervivencia y retrasa el trasplante.

Otras sustancias con propiedades antioxidantes que reducen la fibrosis a nivel experimental son los retinoides, el resveratrol, la quercentina y la N-acetilcisteína<sup>66</sup>.

El TGF- $\beta$  es un potente inductor de la síntesis de colágeno por las células estrelladas. Un trabajo reciente<sup>79</sup> ha demostrado que la cantidad de TGF- $\beta$  tanto en plasma como en hígado se reduce tras tratamiento con interferón  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Por ello, un tratamiento dirigido a disminuir la producción de esta citocina, o bien a inhibir su acción, tiene una base racional. En este sentido, la utilización de receptores solubles tipo II inhibidores del TGF- $\beta$  ha logrado reducir la fibrogénesis en ratas<sup>80</sup>. Incluso se ha planteado que este efecto antifibrótico es dependiente de la dosis<sup>81</sup>. A la hora de diseñar estudios en el ser humano, se debe tener en cuenta que el bloqueo del TGF- $\beta$  comporta una alteración de los mecanismos reguladores del crecimiento, por lo que puede aumentar el riesgo de neoplasias<sup>82</sup>.

El factor de crecimiento hepatocitario (HGF) es otra citocina que ha mostrado propiedades antifibróticas en estudios experimentales<sup>67</sup>, aunque faltan estudios en humanos.

Tanto el IFN- $\alpha$  como el IFN- $\gamma$  son citocinas con propiedades antivirales e inmunomoduladoras. Se ha propuesto que el interferón, principalmente el IFN- $\gamma$ , inhibe las CEH, disminuyendo la fibrosis en modelos animales<sup>83,84</sup>.

Existe escasa experiencia en humanos, pero los resultados iniciales son esperanzadores<sup>85</sup>. El IFN- $\alpha$  está siendo utilizado ampliamente como antiviral en el tratamiento de la hepatitis C. La combinación de IFN- $\alpha$  con ribavirina se asocia a una clara reducción en la progresión de la fibrosis en estos pacientes<sup>86</sup>. Incluso en los que no responden al interferón, su administración prolongada se acompaña de una mejoría del estadio de fibrosis independientemente del genotipo<sup>87</sup>, lo que apunta a un efecto antifibrótico inherente al IFN- $\alpha$ . En los últimos años se han publicado varios ensayos clínicos en humanos en los que se observa mejoría de los parámetros de fibrosis, tanto séricos como histológicos. Así, el tratamiento con IFN- $\alpha$  se asocia a un descenso en las concentraciones séricas del péptido N-terminal del procolágeno III (PIINP)<sup>88-90</sup> y también del colágeno tipo IV<sup>89,91</sup>, ambos reflejo de fibrogénesis hepática. Asimismo, se ha evidenciado un descenso de las concentraciones séricas de inhibidor tisular de la metaloproteína-1 (TIMP-1) en pacientes tratados con IFN- $\alpha$ <sup>92</sup>, sobre todo en los respondedores. En el estudio histológico la fibrosis no progresó e incluso mejoró. Una amplia serie de pacientes publicada recientemente<sup>93</sup> mostró que el IFN- $\alpha$  mejoraba el estadio de fibrosis hepática en el 60% de los pacientes respondedores, lo que se correlacionaba con un descenso en las concentraciones séricas de PIINP. El mecanismo por el cual el IFN- $\alpha$  ejerce su efecto antifibrótico no se conoce bien, pero se atribuye a su capacidad para inhibir la síntesis de colágeno *in vitro* y para aumentar la actividad de las metaloproteasas (con lo que se acelera la fibrólisis)<sup>94</sup>, además de tener un efecto inhibidor directo de la activación de las CEH. Los ensayos con interferón en los pacientes trasplantados son escasos, generalmente no aleatorios, y con un número reducido de pacientes. En los pacientes con hepatitis C recurrente, la tasa de respuesta sostenida virológica que se obtiene con la combinación interferón-ribavirina es de aproximadamente un 20% (8-33%), y en general se asocia con una mejoría histológica, sobre todo de la actividad necroinflamatoria, pero también de la fibrosis<sup>95</sup>.

La pentoxifilina, una metilxantina que se utiliza en la arteriopatía periférica, atenúa la fibrogénesis en cultivos de CEH y en animales a través de diversos mecanismos: inhibiendo la expresión del ARNm del procolágeno I y III, y también disminuyendo la acción del PDGF y del TGF- $\beta$ 1<sup>96,97</sup>. Se espera la realización de estudios en el ser humano para valorar la eficacia de este prometedor fármaco. Se han investigado otras sustancias que interfieren de alguna forma en las señales intracelulares que estimulan la fibrogénesis y, por tanto, la activación de las células estrelladas, como la simvastatina<sup>98</sup>, la amilorida, la tricostatina A (inhibidor de la deacetilasa histonal), el TNP 470 (análogo sintético de la fumagilina), péptidos solubles Arg-Gly-Asp o el ácido S-farnesiltiosalicílico. Todos estos compuestos presentan buenos resultados antifibróticos en modelos animales, si bien es necesaria su confirmación en humanos.

Un problema frecuente que se da en pacientes receptores de un trasplante hepático es la mayor rapidez con la que desarrollan fibrosis. Se ha descrito que la rapamicina (si-

rolimus) inhibe la proliferación de las CEH *in vitro* y disminuye la fibrogénesis en ratas, lo que abre una puerta para futuros ensayos clínicos con este inmunosupresor encaminados a valorar su efecto antifibrótico<sup>99</sup>.

En un estudio reciente se ha observado que la esfingosina 1-fosfato inhibe la proliferación de células estrelladas activadas a través de un mecanismo que incluye la liberación de prostaglandina E2 y AMPc dependiente de la citoquinasa 2, lo que convierte a la esfingosina 1-fosfato en un potente antiproliferativo para las CEH en cultivo<sup>100</sup>. El estradiol es otro fármaco que inhibe la activación de las CEH en modelos experimentales y, aunque el mecanismo no está claro, parece ser que esta acción la realiza a través del aumento del IFN- $\gamma$  y/o la inhibición de la peroxidación lipídica<sup>101</sup>.

El bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona con fármacos inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina o con antagonistas del receptor de la angiotensina II ha servido en varias enfermedades, sobre todo renales y cardíacas, para reducir la fibrosis. Las CEH poseen receptores de tipo I de la angiotensina II de forma que proliferan y se contraen *in vitro* en presencia de angiotensina II<sup>26</sup>. Estudios en ratas han mostrado que el bloqueo del receptor tipo I de la angiotensina II con irbesartán<sup>102</sup> y con candesartán<sup>103</sup> reduce la sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 y de colágeno tipo I. El beneficio potencial de los antagonistas de los receptores de la angiotensina II en la fibrosis hepática debe ser sopesado frente a sus efectos adversos sobre la hemodinámica renal y sistémica del paciente cirrótico<sup>104</sup>. En la misma línea de fármacos que antagonizan la vasoconstricción se sitúan los antagonistas de la endotelina 1. Basándose en las propiedades fibrogénicas de la endotelina 1<sub>A</sub>, se han investigado los antagonistas del receptor de la endotelina 1<sub>A</sub> como agentes antifibróticos, con buenos resultados<sup>105</sup>. No obstante, el antagonismo de los receptores de la endotelina puede tener efectos sistémicos, por lo que hay que ser cautos a la hora de utilizar estos fármacos en el paciente cirrótico.

A pesar de que se sabe que el hígado recibe inervación adrenérgica, pocos estudios se han centrado en el papel de esta inervación en la fibrogénesis hepática. Observaciones recientes<sup>106</sup> indican que tanto la destrucción directa de fibras noradrenérgicas como la administración de antagonistas adrenérgicos (prazosín) inhiben el desarrollo de fibrosis hepática en ratas.

Se han publicado efectos beneficiosos con vasodilatadores, especialmente donadores de óxido nítrico. En el estudio de Failli et al<sup>107</sup>, la nitroglicerina ejerció un efecto antifibrótico al inhibir la proliferación, motilidad y contractilidad de las CEH activadas en cultivo.

Los ácidos grasos poliinsaturados potencian la fibrosis experimental vía generación de radicales libres. A la inversa, una dieta rica en ácidos grasos saturados parece reducir la fibrosis hepática en ratas. Por otra parte, los suplementos de cinc en la dieta también tienen propiedades antifibróticas<sup>66</sup>.

Se han descrito plantas medicinales con poder para inhibir la activación de las CEH. Destaca el *sho-saiko-to*, una mezcla de 7 preparados herbales que se utiliza amplia-

mente en Japón en pacientes con hepatitis crónica y cirrosis. Se cree que puede prevenir el desarrollo de hepatocarcinoma en cirróticos<sup>108</sup>. En modelos experimentales, inhibe la activación y proliferación de células estrelladas a través de una disminución del estrés oxidativo<sup>67</sup>. La *Salvia miltiorrhiza* (*dan-shen*) inhibe la expresión del TGF-β y la síntesis de colágeno mediante una disminución en la peroxidación lipídica. También se postula que induce la apoptosis de las CEH<sup>109-111</sup>. Otra planta medicinal estudiada ha sido la glicirricina, derivada del regaliz, que disminuye la fibrosis en ratas a través de un efecto antioxidante e inhibidor del factor nuclear kappa B (NF-κB). Las primeras experiencias en humanos muestran que el tratamiento parenteral con glicirricina disminuye el riesgo de desarrollar cirrosis<sup>112</sup> y hasta se ha publicado un caso de regresión de la misma tras este tratamiento<sup>113</sup>.

### **Disminución de la síntesis de la matriz extracelular**

Dado que en la fibrosis hepática existe un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular, se han diseñado terapias dirigidas a disminuir la síntesis de colágeno o bien encaminadas a aumentar su degradación. Algunos de los agentes antifibróticos anteriormente expuestos tienen varios mecanismos de acción. Por ejemplo, el IFN-γ y la pentoxifilina, además de evitar la activación de las CEH, también disminuyen la síntesis de colágeno en dichas células estrelladas ya activadas.

La utilización de inhibidores de la prolil-4-hidroxilasa, una enzima que participa en la síntesis de colágeno, es una opción terapéutica que ha dado buenos resultados en animales de experimentación. El S-4682 es un potente inhibidor de esta enzima que reduce la fibrosis hepática en ratas con cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub>, con un descenso concomitante en la formación de ascitis<sup>66</sup>. El HOE 077 inhibe la hidroxilación de la prolina (con lo que disminuye la síntesis de colágeno)<sup>114</sup>, aunque su principal mecanismo de acción es evitar la activación de las células estrelladas<sup>115,116</sup>.

La halofuginona es un inhibidor de la síntesis de colágeno que previene y disminuye la fibrosis en ratas<sup>117,118</sup>. También mejora la regeneración hepática en ratas cirróticas tras hepatectomía parcial<sup>119</sup>. El tratamiento tópico con halofuginona en un paciente con enfermedad de injerto contra huésped crónica provocó una disminución de la síntesis de colágeno<sup>120</sup>. Estos resultados favorables, junto con el hecho de que es posible su administración vía oral, abren la posibilidad de utilizar la halofuginona como antifibrótico.

### **Estímulo de la degradación de la matriz extracelular**

La administración intraperitoneal de adenosina a ratas con cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub> aumentó la actividad colagenolítica del hígado y aceleró su recuperación<sup>121</sup>. El activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) se ha probado en modelos animales. Su administración a ratas

en forma de vector adenoviral que codifica el uPA es un ejemplo de terapia génica. Una vez que el vector ha llegado al hígado cirrótico de la rata, éste comienza a producir uPA, lo que aumenta la expresión de colagenasa y revierte la fibrosis hepática<sup>66</sup>.

Los fármacos antifibróticos no son específicos del hígado y su aplicabilidad clínica puede verse limitada por los efectos adversos que se producen si los fármacos se administran de forma sistémica. Se requiere el desarrollo de sistemas de entrega dirigida (diana) de fármacos que afecten de forma selectiva a las células productoras de la matriz extracelular hepática. Los sitios de unión que expresan las CEH activadas se consideran potenciales dianas para moléculas transportadoras (*carriers*) de fármacos antifibróticos. Así, el receptor manosa-6-fosfato/factor de crecimiento *insuline-like* tipo II (M6P/IGF-II) está sobreexpresado en las CEH activadas. Se ha observado que la administración intravenosa de albúmina modificada con manosa-6-fosfato se sigue de un aumento de la captación de ésta por parte de las CEH de la rata<sup>67</sup>; es más, el complejo M6P-albúmina es internalizado selectivamente por las células estrelladas<sup>122</sup>, lo que podría utilizarse para iniciar la administración de fármacos antifibróticos que se dirijan a las CEH activadas y actúen selectivamente sobre ellas. De momento, todas estas alternativas se han estudiado bien en experimentación celular y animal, bien en pacientes inmunocompetentes, relegando los estudios en transplantados hepáticos a una fase posterior.

En resumen, actualmente no existen tratamientos específicos para la fibrosis crónica en humanos, y la mejor opción terapéutica consiste en la identificación y eliminación de la noxa causal. La evidencia disponible indica una eficacia potencial del IFN-α como agente antifibrótico, independientemente de su utilidad como antiviral, dado que es el único fármaco que ha demostrado alterar la progresión de la fibrosis hepática en ensayos clínicos. La modulación de citocinas (aplicación de antagonistas de factores de crecimiento o de péptidos y receptores solubles inactivadores de citocinas) es un abordaje con grandes posibilidades de éxito. Las áreas más prometedoras en la investigación antifibrótica son las intervenciones específicas sobre la activación de las CEH. En este sentido, se esperan futuros estudios con sistemas de entrega génica específica para el hígado.

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-50.
2. Ballardini G, Degli Esposti S, Bianchi FB, De Giorgi LB, Faccani A, Biolchini L, et al. Correlation between Ito cells and fibrogenesis in an experimental model of hepatic fibrosis. A sequential stereological study. *Liver* 1983;3:48-63.
3. Eng FJ, Friedman SL. Fibrogenesis I. New insight into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol* 2000;279:G7-G11.
4. Maher JJ. Leukocytes as modulators of stellate cell activation. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:917-21.

5. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:397-416.
6. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2002; 21:351-72.
7. Eng FJ, Friedman SL. Transcriptional regulation in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:385-95.
8. Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001;21:337-49.
9. Pinzani M, Gentilini A, Caligiuri A, De Franco R, Pellegrini G, Milani S, et al. Transforming growth factor b1 regulates platelet-derived growth factor subunit in human liver fat-storing cells. *Hepatology* 1995;21:232-9.
10. Pinzani M, Milani S, Grappone C, Weber FL, Gentilini P, Abboud HE. Expression of platelet derived growth factor and its receptors in a model of acute liver injury. *Hepatology* 1994; 19:701-7.
11. Pinzani M, Milani S, Herbst H, De Franco R, Grappone C, Gentilini A, et al. Expression of platelet derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol* 1996;148:785-800.
12. Marshal CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995;80:179-85.
13. Marra F, Gentilini A, Pinzani M, Choudhury GG, Parola M, Herbst H, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet-derived growth factor's actions on hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997;112:1297-306.
14. Robino G, Parola M, Marra F, Caligiuri A, De Franco RM, Zamara E, et al. Interaction between 4-hydroxy-2,3-alkenals and the platelet-derived growth factor-beta receptor. Reduced tyrosine phosphorylation and downstream signaling in hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2000;275:40561-7.
15. Pinzani M, Marra F, Caligiuri A, De Franco R, Gentilini A, Failli P, et al. Inhibition by pentoxifylline of extracellular signal-regulated kinase activation by platelet-derived growth factor in hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 1996;119:1117-24.
16. Mallat A, Gallois C, Tao J, Habib A, Machouf J, Mavier P, et al. Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J Biol Chem* 1998; 273:27300-5.
17. Datta SR, Brunet A. Cellular survival: a play in three acts. *Genes Dev* 1999;13:2905-27.
18. Mancini R, Benedetti A, Jezequel AM. An interleukin-1 receptor antagonist decreases fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rat liver. *Virchows Arch* 1994;424:25-31.
19. Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:141-8.
20. Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med* 1991;324:933-40.
21. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:129-40.
22. Bissel DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995;96:447-55.
23. Yoo DS, Rockey DC. Endothelin receptor subtypes in liver injury: upregulation and differential signaling in myofibroblast contractility. *Hepatology* 2000;32:328.
24. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-78.
25. Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, et al. Endothelin-1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996;110:534-48.
26. Alam J, Bass NM, Bacchetti P, Gee L, Rockey DC. Hepatic tissue endothelin-1 levels in chronic liver disease correlate with disease severity and ascites. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:199-203.
27. Mallat A, Fouassier F, Preaux AM, Gal CS, Raufaste D, Rosenbaum J, et al. Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells: an endothelin B receptor-mediated pathway. *J Clin Invest* 1995;96:42-9.
28. Bataller R, Ginés P, Nicolás JM, Gorgib MN, García-Ramallo E, Gasull V, et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118:1149-56.
29. Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, et al. Fat-storing cells as liver-specific pericytes: spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest* 1992;90:642-6.
30. Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* 1999;31:1120-30.
31. Ledgerwood EC, Pober JS, Bradly JR. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab Invest* 1999; 79:1041-50.
32. Knittel T, Muller L, Saile B, Ramadori G. Effect of tumour necrosis factor-alpha on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1997;27: 1067-80.
33. Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cells. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997; 151:1265-72.
34. Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, et al. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000;156:1235-43.
35. Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277: 1630-3.
36. Buck M, Kim DJ, Houglum K, Hassanein T, Chojkier M. c-myb modulates transcription of the alpha-smooth muscle actin gene in activated hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G321-G8.
37. Greenwell P, Domínguez-Rosales JA, Mavi G, Rivas-Estilla AM, Rojkind M. Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha(I) collagen gene upregulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; 31:109-6.
38. Iraburu MJ, Domínguez-Rosales JA, Fontana L, Auster A, García-Subijano ER, Covarrubias-Pinedo A, et al. Tumor necrosis factor alpha down-regulates expression of the alpha1(I) collagen gene in rat hepatic stellate cells through a p20C/EBPbeta- and C/EBPdelta-dependent mechanism. *Hepatology* 2000;31:1086-93.
39. Lang A, Schonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappa B in proliferation, activation and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 33:58.
40. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liv Dis* 1990;10:1-10.
41. Davis BH. Transforming growth factor beta responsiveness is modulated by the extracellular collagen matrix during hepatic Ito cell culture. *J Cell Physiol* 1988;136:547-53.
42. Chiquet M, Matthisson M, Koch M, Tannheimer M, Chiquet-Ehrismann R. Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochem Cell Biol* 1996;74:737-44.
43. Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 1996;24:240.
44. Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993; 213:823.
45. Asbert M, Gines A, Gines P. Circulating levels of endothelin in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993;104:1485-91.
46. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
47. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926-31.
48. Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000;105:741-8.
49. Prieto M, Berenguer M, Rimola A, Losnaz C, Barrios C,

- Clemente G, et al. Liver Transplantation in hepatitis C: a Spanish multicenter experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10:771-6.
50. O'Grady JG, Smith HM, Davies SE, Daniels HM, Donaldson PT, Tan KC, et al. Hepatitis B virus reinfection after orthotopic liver transplantation. Serological and clinical implications. *J Hepatol* 1992;14:104-11.
  51. Chazouilleres O, Mamish D, Kim M, Casey K, Ferrell L, Roberts JP, et al. «Occult» hepatitis B virus as source of infection in liver transplant recipients. *Lancet* 1994;343:142.
  52. Wright T, Donegan E, Hsu H, Ferrell L, Lake JR, Kim M, et al. Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 1992; 103:317-22.
  53. Prieto M, Berenguer M, Rayón M, Córdoba J, Argüello L, Carrasco D, et al. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999; 29:250-6.
  54. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim R, Rayon M, et al. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000;32: 673-84.
  55. Feray C, Caccamo L, Alexander GJM, Alexander GS, Ducot B, Gugenheim V, et al. European Collaborative Study on factors influencing the outcome after liver transplantation for hepatitis C. *Gastroenterology* 1999;117: 619-25.
  56. Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, Ferharst J, Zetterman R, Lake J, et al. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1998;28: 823-30.
  57. Berenguer M, Prieto M, Rayón JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V, et al. Natural history of clinically compensated HCV-related graft cirrhosis following liver transplantation. *Hepatology* 2000;32:852-8.
  58. Berenguer M, Prieto M, San Juan F. Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002;36:202-10.
  59. Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122:889-96.
  60. Berenguer M, Rayón M, Prieto M, Aguilera V, Nicolás D, Ortiz V, et al. Are post-transplantation protocol liver biopsies useful in the long-term? *Liver transp* 2001;7:790-6.
  61. Guido M, Rugge M, Leandro G, Fiel I, Thung S. Hepatic stellate cel immunodetection and cirrhotic evolution of viral hepatitis in liver allografts. *Hepatology* 1997;26:310-4.
  62. Burak KW, Kremers W, Batts K, Wiesner RH, Rosen CB, Razonable RR, et al. Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcomes after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* 2002;8:362-9.
  63. Samuel D, Müller R, Alexander G, Fassati L, Ducot B, Benhamou SP, et al. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1993; 329:1842-7.
  64. Kweon YO, Goodman ZD, Dienstag JL, Schiff ER, Brown NA, Burchardt E, et al. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001;35: 749-55.
  65. Davies SE, Portmann BC, O'Grady JG, Aldis PM, Chaggar K, Alexander GJ, et al. Hepatic histological findings after transplantation for chronic hepatitis B virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis. *Hepatology* 1991;13:150-7.
  66. Faust TW. Recurrent primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis after transplantation. *Liver Transpl* 2001;7(11 Suppl 1):99-108.
  67. Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:437-51.
  68. Dufour JF, DeLellis, R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997;127: 981-5.
  69. Solís JA, Morillas JD, Muñoz MT. Fibrogénesis hepática. En: Rodés J, Vilardell F, Puig J, Moreno E, coordinadores. Enfermedades digestivas. Tomo 3: Hígado y vías biliares. Madrid: Aula Médica, 1998; p. 1775-85.
  70. Beno DW, Espinal R, Edelstein BM, Davis BH. Administration of prostaglandin E analogue reduces rat hepatic and Ito cell collagen gene expression and collagen accumulation after bile duct ligation injury. *Hepatology* 1993;17:707-14.
  71. Rambaldi A, Gluud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis. *Liver* 2001;21:129-36.
  72. Cortez-Pinto H, Alexandre P, Camilo ME, Gouveia-Oliveira A, Santos PM, Alves MM, et al. Lack of effect of colchicine in alcoholic cirrhosis: final results of a double blind randomized trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:377-81.
  73. Chiaromonte MG, Cheever AW, Malley JD, Donaldson DD, Wynn TA. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* 2001;34:273-82.
  74. Dharancy S, Canva V, Gambiez L, Paris JC, Desreumaux P. Hepatic deficiency of interleukin 10 in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2000;119:1411.
  75. Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000;118:655-60.
  76. Gluud C, Christensen E. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;(1): CD000551.
  77. Houglum K, Venkataramani A, Lyche K, Chojkier M. A pilot study of the effects of d-α-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997;113: 1069-73.
  78. Parés A, Planas R, Torres M, Caballería J, Viver JM, Acero D, et al. Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. *J Hepatol* 1998;26:615-21.
  79. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, et al. Reduced plasma transforming growth factor-β levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-α therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 1999; 30:1-7.
  80. George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bisell DM. *In vivo* inhibition of rat stellate cell activation by soluble TGF beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12719-24.
  81. Yata Y, Gotwals P, Koteliansky V, Rockey DC. Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF-β soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology* 2002;35:1022-30.
  82. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology* 2001;34:859-67.
  83. Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, Casini A, Manzini R, Jezequel AM, et al. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 1996;23:1189-99.
  84. Sakaida I, Uchida K, Matsumura Y, Okita K. Interferon gamma treatment prevents procollagen gene expression without affecting transforming growth factor-beta 1 expression in pig serum-induced rat liver fibrosis *in vivo*. *J Hepatol* 1998;28: 471-9.
  85. Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:42-8.
  86. Poynard T, McHutchison J, Davis GL, Esteban-Mur R, Goodman Z, Bedossa P, et al. Impact of interferon alfa-2b and ribavirin on progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;32:1131-7.
  87. Sobesky R, Mathurin P, Charlotte F, Moussali J, Olivé M, Vidaud M, et al. Modelling the impact of interferon alfa treatment on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C: a dynamic view. *Gastroenterology* 1999;116:378-86.
  88. Gallorini A, Plebani M, Pontisso P, Chemello L, Masiero M, Mantovani G, et al. Serum markers of hepatic fibrogenesis in chronic hepatitis type C treated with alfa-2a interferon. *Liver* 1994;14:257-64.
  89. Ishibashi K, Kashiwagi T, Ito A, Tanaka Y, Nagasawa M, Toyama T, et al. Changes in serum fibrogenesis markers during interferon therapy for chronic hepatitis type C. *Hepatology* 1996;24:27-31.

90. Suou T, Hosho K, Kishimoto Y, Horie Y, Kawasakia H. Long-term decrease in serum N-terminal propeptide of type III procollagen in patients with chronic hepatitis C treated with interferon alfa. *Hepatology* 1995;22:426-61.
91. Mazzoran L, Tamaro G, Mangiarotti MA, Marchi P, Baracetti S, Gerini U, et al. Effects of interferon therapy on fibrosis serum markers in HCV-positive chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:125-31.
92. Mitsuda A, Suou T, Ikuta Y, Kawasaki H. Changes in serum tissue inhibitor of matrix metalloproteína-1 after interferon alpha treatment in chronic hepatitis C. *C. J Hepatol* 2000;32:666-72.
93. Serejo F, Costa A, Gouveia A, Ramalho F, Batista A, Carneiro de Moura M.  $\alpha$ -interferon improves liver fibrosis in chronic hepatitis C. Clinical significance of the serum N-terminal propeptide of procollagen type III. *Dig Dis Sci* 2001;46:1684-9.
94. Bueno M, Daneri A, Armendáriz-Borunda J. Colestasis-induced fibrosis is reduced by interferon  $\alpha$ 2a and is associated with elevated liver metalloprotease activity. *J Hepatol* 2000;33:915-25.
95. Lavezzo B, Franchello A, Smedile A, et al. Treatment of recurrent hepatitis C in liver transplants: efficacy of a six versus twelve month course of interferon alfa 2b with ribavirin. *J Hepatol* 2002;37:247-52.
96. Desmoulière A, Guoxiong X, Costa AM, Yousef IM, Gabbiani G, Tuchweber B. Effect of pentoxifylline on early proliferation and phenotypic modulation of fibrogenic cells in two rat models of liver fibrosis and on cultured hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999;30:621-31.
97. Raetsch C, Jia JD, Boigm G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, et al. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002; 50:241-7.
98. Mallat A, Preaux AM, Blazejewski S, Dhumeaux D, Rosenbaum J, Mavier P. Effect of simvastatin, an inhibitor of hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase, on the growth of human Ito cells. *Hepatology* 1994;20:1589-94.
99. Zhu J, Wu J, Frizell E, Liu SL, Bashey R, Rubin R, et al. Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation *in vitro* and limits fibrogenesis in an *in vivo* model of liver fibrosis. *Gastroenterology* 1999;117:1198-204.
100. Davaille J, Gallois C, Habib A, Li L, Mallat A, Tao J, et al. Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. *J Biol Chem* 2000;275:34628-33.
101. Shimizu I, Mizobuchi Y, Yasuda M, Shiba M, Ma YR, Horie T, et al. Inhibitory effect of oestradiol on activation of rat hepatic stellate cells *in vivo* and *in vitro*. *Gut* 1999;44:127-36.
102. Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, et al. Effect of angiotensin II type I receptor blockade on experimental hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2001;35:376-85.
103. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, et al. Angiotensin-II type I receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34:745-50.
104. Vlachogiannakos J, Tang AK, Patch D, Burroughs AK. Angiotensine converting enzyme inhibitors and angiotensin II antagonists as therapy in chronic liver disease. *Gut* 2001;49:303-8.
105. Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, et al. An oral endothelin A-receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2000;118:1169-78.
106. Dubuisson L, Desmoulière A, Decourt B, Evadé L, Bedin C, Boussarie L, et al. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology* 2002;35:325-31.
107. Failli P, DeFranco RM, Caliguri A, Gentilini A, Romanelli RG, Marra F, et al. Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;179:479-92.
108. Okita K, Sakaida I, Hino K. Current strategies for chemoprevention of hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62(Suppl 1):24-8.
109. Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. *Salvia miltiorrhiza* monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation. *World J Gastroenterol* 2002;8:515-9.
110. Liu P, Hu Y, Liu C, Liu C, Zhu D. Effects of salvianolic acid A (SA-A) on liver injury: SA-A action on hepatic peroxidation. *Liver* 2001;21:384-90.
111. Wasser S, Ho JM, Ang HK, Tan CE. *Salvia miltiorrhiza* reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 1998;29:760-71.
112. Kumada H. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [stronger neo-minophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62(Suppl 1):94-100.
113. Watanabe M, Uchida Y, Sato S, Moritani M, Hamamoto S, Mishiro T, et al. Report of a case showing a recovery from liver cirrhosis to chronic hepatitis, type C, after glycyrrhizin injection for 2 years and a sustained response by the following interferon therapy. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1947-9.
114. Sakaida I, Uchida K, Hironaka K, Okita K. Prolyl 4-hydroxylase inhibitor (HOE 077) prevents TIMP-1 gene expression in rat liver fibrosis. *J Gastroenterol* 1999;34:376-7.
115. Aoyagi M, Sakaida I, Suzuki C, Segawa M, Fukumoto Y, Okita K. Prolyl 4-hydroxylase inhibitor is more effective for the inhibition of proliferation than for inhibition of collagen synthesis of rat hepatic stellate cells. *Hepatol Res* 2002;23:1-6.
116. Sakaida I, Matsumura Y, Kubota M, Kayano K, Takenaka K, Okita K. The prolyl 4-hydroxylase inhibitor HOE 077 prevents activation of Ito cells, reducing procollagen gene expression in rat liver fibrosis induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Hepatology* 1996;23:755-63.
117. Pines M, Knopov V, Genina O, Lavelin I, Nagler A. Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. *J Hepatol* 1997;27:391-8.
118. Bruck R, Genina O, Aeed H, Alexiev R, Nagler A, Avni Y, et al. Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2001;33:379-86.
119. Spira G, Mawasi N, Paizi M, Anbinder N, Genina O, Alexiev R, et al. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2002;37:331-9.
120. Hagler A, Pines M. Topical treatment of cutaneous chronic graft versus host disease with halofuginone: a novel inhibitor of collagen type I synthesis. *Transplantation* 1999;68:1806-9.
121. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez-Cuenca JA, Trejo-Solís C, López V, Sánchez-Sevilla L, et al. Adenosine reverses a preestablished  $CCl_4$ -induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 2001;34:677-87.
122. Beljaars L, Olinga P, Molema G, De Blieser P, Geerts A, Groothuis GM, et al. Characteristics of the hepatic stellate cell-selective carrier mannose 6-phosphate modified albumin (M6P(28)-HSA). *Liver* 2001;21:320-8.