

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**PATRÓN DE EXPRESIÓN INTRAHEPÁTICO DE LA
CICLOOXIGENASA-2 EN LA INFECCIÓN CRÓNICA
POR EL VIRUS C: PAPEL PATOGENICO EN
FIBROGÉNESIS Y CARCINOGENESIS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Óscar Núñez Martínez

Bajo la dirección de los Doctores:

Gerardo Clemente Ricote
Antonino Jara Albarrán
Carmelo García Monzón

Madrid,

ISBN: 84-669-2609-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

PATRÓN DE EXPRESIÓN INTRAHEPÁTICO DE LA

CICLOOXIGENASA-2

EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS C:

PAPEL PATOGENICO EN FIBROGÉNESIS Y CARCINOGENESIS

OSCAR NÚÑEZ MARTÍNEZ

DIRECTORES DE TESIS

Prof. Gerardo Clemente Ricote

Prof. Antonino Jara Albarrán

Dr. Carmelo García Monzón

MADRID 2003

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Gerardo Clemente por su confianza depositada en mi persona durante este periodo de mi formación, por su ejemplo como médico y amigo, y por haberme dirigido y permitido realizar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Doctor Carmelo García Monzón por su valiosa dirección en los aspectos más técnicos de esta Tesis Doctoral, y por su paciencia, apoyo y amistad.

Al Profesor Antonino Jara Albarrán por su amabilidad y cooperación para poder completar y realizar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al jefe del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Dr. Enrique Cos Arregui, al tutor de residentes, Dr. Rafael Bañares Cañizares, y a todos los adjuntos y residentes, que durante estos años hemos convivido como una familia a través del aprendizaje de la medicina.

A los becarios del laboratorio de investigación en Hepatología, Pedro Majano y Arantxa Apolinario, y a la técnico de laboratorio, Raquel Lorente, por su inestimable ayuda y colaboración, como por su compañerismo y amistad.

A los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y del Hospital Universitario Santa Cristina por todas las facilidades para la obtención y procesamiento de las muestras hepáticas estudiadas.

A los miembros del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Lisardo Boscá, Paloma Martín Sanz y Amalia Fernández Martínez por su colaboración para la realización de este trabajo.

Y no por último, menos importante, sino todo lo contrario, a mi familia en Pamplona, y especialmente a mi familia aquí en Madrid, Mar, por su amor, apoyo y comprensión, durante este largo periodo de tiempo.

ÍNDICE

INDICE	V
Abreviaturas	X
INTRODUCCIÓN	1
1 Hepatitis crónica: Definición, tipos y prevalencia	2
2 Hepatitis crónica por VHC	4
2.1 Epidemiología del VHC	4
2.1.1 Vías de transmisión	
2.1.1.1 Vía parenteral	
2.1.1.2 Otras vías de transmisión	
2.2 Historia natural de la infección por el VHC	9
2.2.1 Infección aguda	
2.2.2 Infección crónica	
2.2.3 Cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular	
2.2.4 Otras manifestaciones de la infección por el VHC	
2.3 Histología del VHC	12
2.4 Patogenia de la lesión hepática por el VHC	15
2.4.1 Inflamación	
2.4.2 Fibrosis	
2.4.2.1 La matriz extracelular normal	
2.4.2.2 La matriz extracelular en la fibrosis hepática	
2.4.2.2.1 Iniciación	
2.4.2.2.2 Perpetuación	
2.4.2.2.3 Remodelación tisular y Metaloproteinasas	
2.4.3 Hepatocarcinogénesis	
3 Metabolismo de los eicosanoides	26
3.1 Ácido araquidónico y liberación desde la membrana celular	26
3.2 Vía de la ciclooxigenasa: Síntesis de prostanoïdes	28
3.2.1 Actividades enzimáticas de la ciclooxigenasa	
3.2.2 Mecanismo de acción de los prostanoïdes	
3.2.3 Efectos de los prostanoïdes	

3.3	Isoformas de la enzima ciclooxigenasa	30
4	Ciclooxigenasa 2 (COX-2)	33
4.1	Estructura genómica y molecular	33
4.2	Localización celular	34
4.3	Regulación de la expresión	34
4.4	Acciones biológicas	35
5	Ciclooxigenasa 2 e hígado	36
5.1	Expresión de la COX-2 por los hepatocitos	36
5.2	Funcionalidad de la COX-2 a nivel hepático	36
5.3	Expresión de la COX-2 en las hepatopatías crónicas	37
	5.3.1 Hepatopatía alcohólica	
	5.3.2 Hepatopatía vírica	
	5.3.3 Cirrosis hepática	
5.4	Expresión de la COX-2 y hepatocarcinoma	40
	5.4.1 Implicación de la COX-2 en la hepatocarcinogénesis	
	5.4.2 Expresión de la COX-2 en el CHC	
5.5	Expresión de la COX-2 y colangiocarcinoma	43
	OBJETIVOS	45
1	Introducción	46
2	Hipótesis	46
3	Objetivos	47
	PACIENTES Y METODOS	48
1	Pacientes	49
	1.1 Selección de los pacientes	49
	1.2 Características clínicas	52
2	Estudio de las muestras hepáticas	53
	2.1 Procesado de las muestras	53

2.2	Histología: valoración y clasificación	54
2.3	Estudios con muestras de tejido hepático	55
2.3.1	Expresión enzimática: Western-Blot	
2.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
2.3.3	Actividad enzimática	
2.3.4	Inmunohistoquímica	
2.3.4.1	Tinción por inmunoperoxidasa	
2.3.4.2	Valoración semicuantitativa	
3	Otras determinaciones	61
3.1	Determinaciones analíticas	61
3.2	Determinaciones serológicas y víricas	61
4	Análisis estadístico	62
4.1	Estadística descriptiva	62
4.2	Estadística analítica	62
	RESULTADOS	63
1	Expresión intrahepática de la COX-2 en la Infección crónica por el VHC	64
1.1	Valoración de la expresión de la COX-2	64
1.2	Actividad enzimática de la COX-2	67
1.3	Estudio inmunohistoquímico	68
2	Estudio comparativo de la expresión de la COX-2 entre la cirrosis hepática por el VHC y por alcohol	73
3	Expresión y actividad de la MMP-2 y MMP-9 en la infección crónica por el VHC	75
4	Relación de la expresión intrahepática de la COX-2 con parámetros clínicos y de laboratorio en los pacientes con infección crónica por el VHC	78
5	Relación de la expresión intrahepática de la COX-2 con el grado y estadio histológico en pacientes con infección crónica por el VHC	79

DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES	88
RESUMEN	91
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXO	120

ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
AMP _C	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CC	Colangiocarcinoma
CE	Células estrelladas
CH	Cirrosis hepática
CHC	Carcinoma hepatocelular
COX	Ciclooxigenasa
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EHDG	Enfermedad hepática por depósito de grasa
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ELISA	Enzimoimmunoanálisis
GGT	Gammaglutamil transaminasa
GOT	Transaminasa glutámicooxalacética
GPT	Transaminasa glutámicopirúvica
HBsAg	Antígeno australia o antígeno de superficie del VHB
HC	Hepatitis crónica
HCL	Hepatitis crónica leve
HCG	Hepatitis crónica grave
IFN- α	Interferón α
IFN γ	Interferón γ
IGF-1	Factor de crecimiento derivado de la insulina
IL-6	Interleuquina 6
kD	KiloDalton
LPO	Lipooxigenasa
LT	Leucotrienos
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas
NF- κ B	Factor nuclear kappa B

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

INTRODUCCIÓN

1.- HEPATITIS CRÓNICA: DEFINICIÓN, TIPOS Y PREVALENCIA

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

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

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

Tabla 1

ETIOLOGÍA DE LA CIRROSIS HEPÁTICA
Virus de la hepatitis: Virus B y C Alcohol Hepatitis autoinmune Colestasis crónicas (Cirrosis biliar primaria, Colangitis esclerosante primaria, Secundaria a lesión biliar, Atresia biliar) Fármacos Obstáculo al drenaje venoso hepático Enfermedad hepática por depósito de grasa Enfermedades con base genética (hemocromatosis, enfermedad Wilson, déficit de α_1 antitripsina...) Criptogénica

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

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

2.- HEPATITIS CRÓNICA POR VHC

2.1.- EPIDEMIOLOGÍA DEL VHC

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

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

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

2.1.1.- Vías de transmisión

2.1.1.1.- Vía parenteral

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

a) Adicción a drogas por vía intravenosa

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

b) Transfusión de hemoderivados

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

c) Hemodiálisis

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

d) Trasplante de órganos

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

e) Riesgo ocupacional

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

2.1.1.2.- Otras vías de transmisión

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

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

a) Vía sexual

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

b) Transmisión vertical

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

c) Transmisión intrafamiliar

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

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

d) Miscelánea

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

2.2.- HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR EL VHC

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

2.2.1.- Infección aguda

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

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

2.2.2.- Infección crónica

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

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

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

2.2.3.- Cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular

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

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

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

2.2.4.- Otras manifestaciones de la infección por el VHC

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

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

2.3.- HISTOLOGIA DEL VHC

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

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

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

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

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

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

TABLA 2

Sistema para la clasificación de las hepatitis crónicas de Scheuer

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

2.4.- PATOGENIA DE LA LESIÓN HEPÁTICA POR EL VHC

2.4.1.- Inflamación

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

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

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

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

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

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

2.4.2.- Fibrosis

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

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

2.4.2.1.- La matriz extracelular normal

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

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

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

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

2.4.2.2.- La matriz extracelular en la fibrosis hepática

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

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

2.4.2.2.1.- Iniciación

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

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

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

2.4.2.2.2.- Perpetuación

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

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

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

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

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

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

2.4.2.2.3 Remodelación tisular y Metaloproteinasas

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

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

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

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

2.4.3.- Hepatocarcinogénesis

Se han identificado diferentes factores de riesgo de CHC como la infección crónica por el VHB y el VHC, que suman más del 80% de los casos de CHC en el mundo. Otros factores son la exposición a la aflatoxina B₁, el tabaquismo y el consumo de alcohol. Enfermedades genéticas como la hemocromatosis, la porfiria o el déficit de α_1 -antitripsina también suponen un factor de riesgo. En todo caso, la CH por sí misma y de cualquier etiología, es un factor de riesgo de CHC ya que al menos del 60 al 80% de los CHC se desarrollan sobre una CH. Esto podría sugerir la existencia de diferentes vías patogénicas para el CHC que aparece sobre un hígado cirrótico o en un hígado sin cirrosis (105,106).

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

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

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

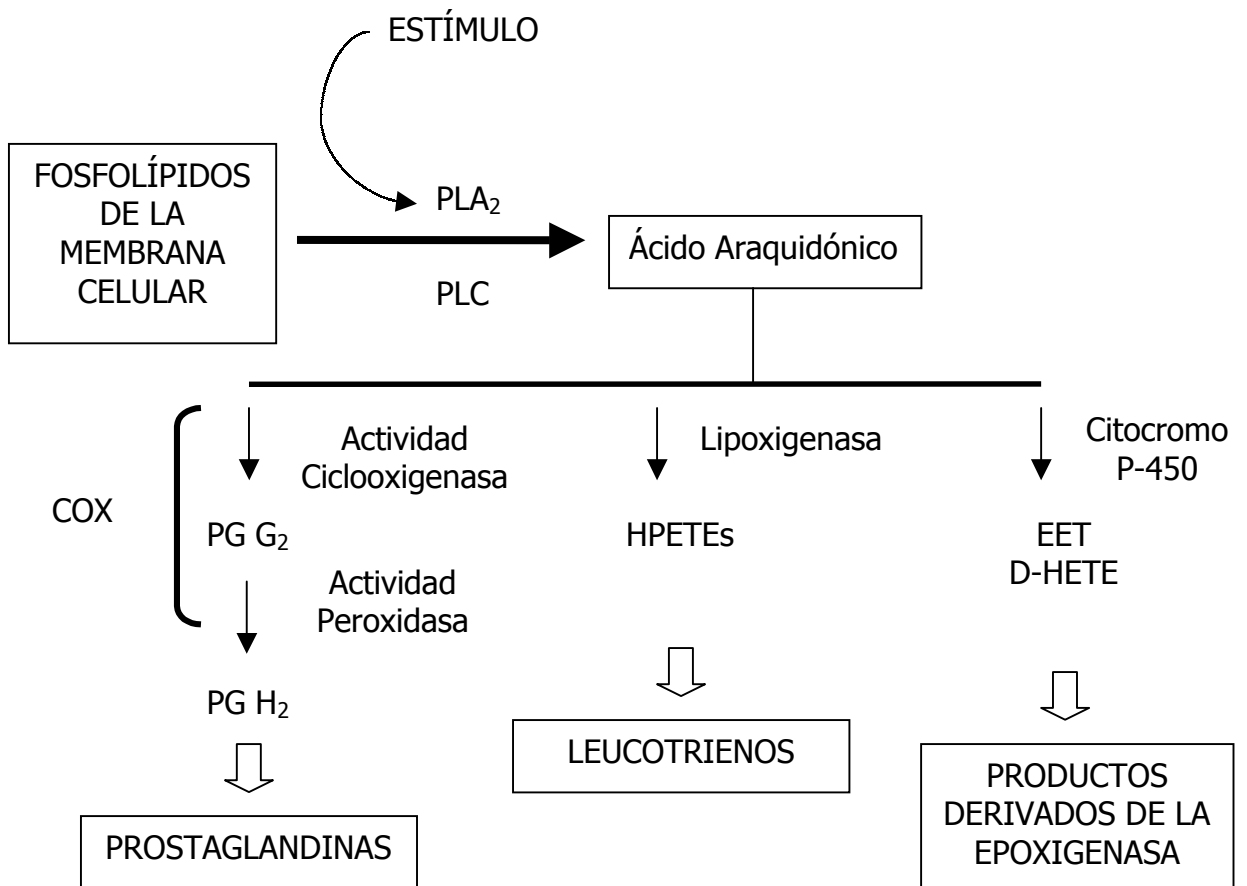
3.- METABOLISMO DE LOS EICOSANOIDES

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

3.1.- ÁCIDO ARAQUIDÓNICO Y LIBERACIÓN DESDE LA MEMBRANA CELULAR

El primer paso en la producción de eicosanoides es la liberación del AA de la membrana fosfolipídica por la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) en respuesta a diferentes estímulos (bradiquinina, angiotensina II, trombina, histamina, leucotrienos (LT), citoquinas, factores de crecimiento) y la fosfolipasa C que cataliza la formación de AA y glicerol a partir de los fosfolípidos liberados de la membrana celular. La actividad de las fosfolipasas es el paso limitante que condiciona la velocidad de síntesis de los eicosanoides (108).

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



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

FIGURA 1: Metabolismo del ácido araquidónico

3.2.- VÍA DE LA CICLOOXIGENASA: SÍNTESIS DE PROSTANOIDES

3.2.1.- Actividades enzimáticas de la ciclooxigenasa

La COX o prostaglandina endoperóxido-sintetasa (PGH-sintetasa) cataliza la transformación del AA a PGH₂. La PGH-sintetasa posee dos actividades catalíticas, la primera ciclooxigenasa que produce un endoperóxido intermedio denominado PGG₂, sobre el cual actúa la segunda actividad catalítica que es una peroxidasa y la transforma en PGH₂ (108).

A partir de la PGH₂ por acción de diferentes endoperóxido isomerasas se sintetizan la prostaciclina (PGI₂), PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} y los tromboxanos (TXA) dependiendo de la maquinaria enzimática presente en los diferentes tipos celulares (108,110).

3.2.2.- Mecanismo de acción de los prostanoides

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

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

3.2.3.- Efectos de los prostanoides

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

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

- En el lecho vascular ejercen importantes acciones sobre la función plaquetaria, siendo por ejemplo la PGI₂, sintetizada a nivel del endotelio vascular, uno de los inhibidores más potentes de la agregación plaquetaria. Además producen el efecto vasodilatador ya previamente comentado (108,111,112).

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

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

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

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

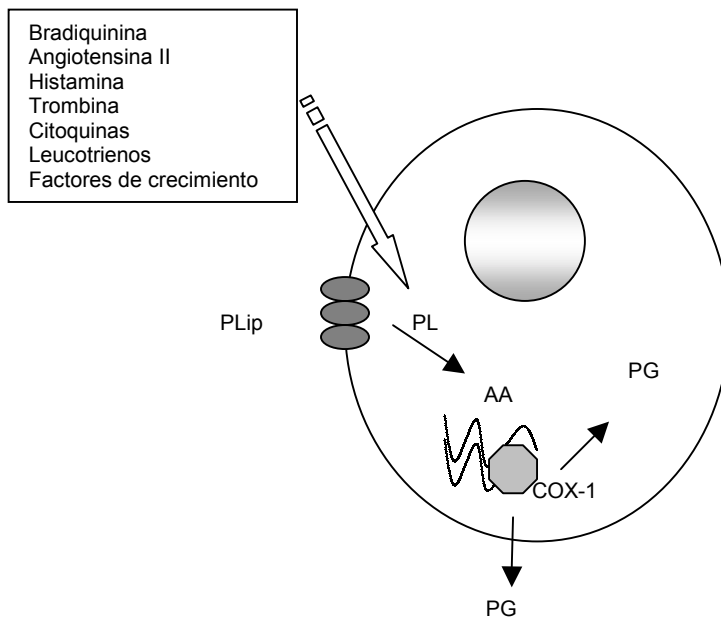
3.3.- ISOFORMAS DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA

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

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

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

Célula en condiciones normales



Célula en condiciones patológicas

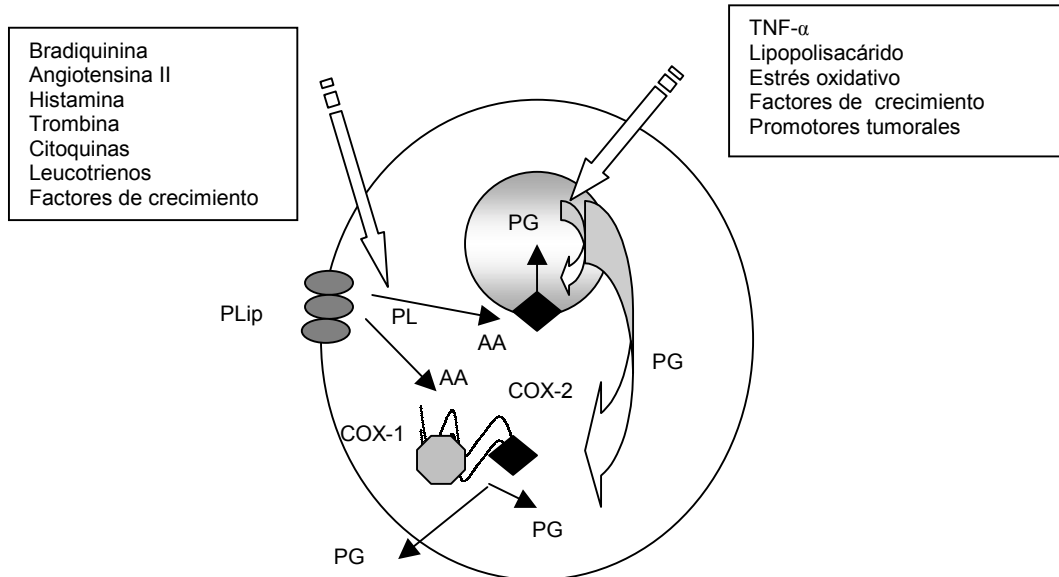


Figura 2

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

4.- CICLOOXIGENASA 2 (COX-2)

4.1.- ESTRUCTURA GENÓMICA Y MOLECULAR

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

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

La estructura tridimensional obtenida mediante cristalografía por rayos X es idéntica entre ambas isoformas de la COX, al igual que su actividad catalítica y su inhibición por parte de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). La COX-2 tiene un peso molecular de 71 kD y está formada por unos 600 aminoácidos, compartiendo un 63% de su secuencia con la COX-1. Los residuos del canal de unión con el ligando, los sitios catalíticos y los residuos inmediatamente próximos son idénticos salvo por dos posiciones (Ile por Val en posiciones 434 y 523) (111,112). También existen diferencias en sus terminaciones NH₂ y COOH (109).

4.2.- LOCALIZACIÓN CELULAR

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

4.3.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN

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

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

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

4.4.- ACCIONES BIOLÓGICAS

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

5.- CICLOOXIGENASA 2 E HÍGADO

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

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

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

En el hígado las PG se han involucrado en la regeneración hepática al estimular la proliferación de los hepatocitos (123). Los factores de crecimiento de hepatocitos (HGF) y epidérmico (EGF) provocan la activación de la PLA₂ y la liberación del AA, con la producción de PG que actuarían como mediadores autocrinos y provocarían el aumento de síntesis de ADN (124).

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

demuestra la síntesis y liberación a la MEC de MMP-2 y MMP-9 en respuesta a la PGE₂ añadida al medio de cultivo, siendo ésta paralela al nivel de expresión de la COX-2 (125).

En la patogenia de la hipertensión portal, mediante estudios de modelos animales, se ha implicado a las PG, fundamentalmente la PGI₂, en la vasodilatación e hiperemia esplácnica (126-129). Otros estudios más recientes han puesto de manifiesto que la producción de TXA₂, derivado de la COX-2, juega un papel fundamental en el aumento de la resistencia vascular a nivel sinusoidal (130,131), aunque el papel patogénico de las PG, en la hipertensión portal sinusoidal, aún no está establecido (132).

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

5.3.1.- Hepatopatía alcohólica

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

5.3.2.- Hepatopatía vírica

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

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

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

5.3.3.- Cirrosis hepática

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

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

5.4.- EXPRESIÓN DE LA COX 2 Y HEPATOCARCINOMA

El estudio de la relación entre la COX-2 y la hepatocarcinogénesis ha derivado de la implicación de la COX-2 en la carcinogénesis en otros tejidos, principalmente en el cáncer de colon (146). La observación de esta asociación de la COX-2 y de las PG derivadas de su activación, PGE₂ fundamentalmente, en la iniciación, mantenimiento del crecimiento y supervivencia de las células tumorales se ha relacionado con la inducción de la neoangiogénesis vía factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (147-149) y a la inhibición de la vía apoptótica y aumento de la adhesión a la MEC de las células que sobre-expresaban la COX-2 (150).

5.4.1.- Implicación de la COX 2 en la hepatocarcinogénesis

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

infección por el VHC y mediante transfección de la proteína core del VHC a líneas celulares humanas de hepatoblastoma (células HepG2), Tai y cols, demostraron la activación del NFκB y su implicación en la resistencia a la apoptosis celular (151). El mecanismo a través del cual el NF-κB causa la resistencia a la apoptosis no queda aclarado pero si lo ponemos en relación con los hallazgos referidos anteriormente en otros tipos celulares (118,119), la implicación de la COX-2 no puede ser descartada. En otro estudio en líneas celulares humanas de hepatoma, se demostró cómo un inhibidor selectivo de la COX-2, el NS-398, producía una inhibición de la proliferación de las células que sobre-expresaban la COX-2 y una disminución de la producción de PGE₂, debido en parte al aumento de la tasa de apoptosis (152). Esta relación entre la expresión de la COX-2 y la inhibición de la apoptosis con el consiguiente aumento de la proliferación celular, ha sido también demostrada en otros estudios mediante la supresión de la actividad de la COX-2 con sulindaco, nimesulida o NS-398 (153-156). Estos hallazgos representan una base racional para el uso de inhibidores de la COX-2 en la quimioprevención del CHC (157).

Por último existen estudios que relacionan la expresión de la COX-2 y el aumento de la capacidad de invasión celular por líneas celulares de hepatoma vía activación de MMPs por la PGE₂, provocado por la proteína X del VHB (158). Otros estudios sugieren que la COX-2 sería un factor permisivo de la invasión celular tumoral pero no suficiente en sí mismo (159).

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

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

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

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

5.5.- EXPRESIÓN DE COX 2 Y COLANGIOCARCINOMA

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

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

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

OBJETIVOS

1.- INTRODUCCIÓN

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

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

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

2.- HIPÓTESIS

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

3.- OBJETIVOS

Para demostrar nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

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

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

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

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

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

PACIENTES Y MÉTODOS

1.- PACIENTES

1.1.- SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

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

Tabla 3

Características de los pacientes según la lesión hepática y su etiología

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

Los criterios diagnósticos etiológicos son los expuestos a continuación:

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

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

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

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

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

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

Tabla 4

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

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

1.2.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

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

Tabla 5
Características clínicas y analíticas de los pacientes

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

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

2.- ESTUDIO DE LAS MUESTRAS HEPÁTICAS

2.1.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS

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

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

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

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

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

2.2.- HISTOLOGÍA: VALORACIÓN Y CLASIFICACIÓN

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

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

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

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

2.3.- ESTUDIOS CON MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO

2.3.1.- Expresión enzimática: Western Blot

Una parte de las muestras de tejido hepático de los 32 pacientes con HC por el VHC (22 HCL, 5 HCG, y 5 CH), de los 6 pacientes con CH por alcohol y de los 10 pacientes que conforman el grupo control se homogenizaron en un medio que contenía: MgCl₂ 1 mmol/L, EGTA 1 mmol, glicerol al 10%, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato al 0,5%, β-mercaptoetanol 1 mmol/L, PMSF 0,1 mmol/L, Tris 10 mmol/L y llevado a pH 7,5 con ácido clorhídrico. Los extractos se mezclaron en un vortex durante 30 minutos a 4°C y después centrifugados a 13000 g durante 20 minutos, obteniendo un sobrenadante que se almacenó a -20°C. Posteriormente las muestras se hirvieron en un buffer de Laemmli y cantidades similares de proteína (20 a 30 µg) se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10-12%. Los geles se transfirieron a una membrana de PDVF (Amersham®) y tras ser bloqueados con leche deshidratada desnatada al 5%, se incubaron con los anticuerpos específicos: anti-COX-2, anti-MMP-2, anti-MMP-9 (Cayman Chemical®), anti-Actina (Sigma®) al 1:1000. Se revelaron con un ECL™-kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham®).

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

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

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

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

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

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

2.3.3.- Actividad enzimática

Las concentraciones de PGE₂ se determinaron en homogenados de biopsias hepáticas, realizados en un buffer de ensayo (0,1 mol/L de fosfato a pH 7,5 que contenía 0,9% de albúmina sérica bovina), de 9 pacientes con HC por el VHC (3 HCL, 3 HCG, 3 CH) y de 6 pacientes control (3 esteatosis no alcohólica y 3 hígado normal). Tras ser tratados los homogenados con solución 1:4 de agua/etanol y 10 µl de ácido acético glacial, las muestras fueron purificadas en una minicolumna Amprep C18, eluido con acetato etílico y evaporadas hasta su secado bajo nitrógeno. Entonces los niveles de PGE₂ fueron determinados mediante un enzimo-inmunoanálisis (ELISA) según las indicaciones del fabricante (Amersham[®]).

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

2.3.4.- Inmunohistoquímica

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

2.3.4.1.- Tinción por inmunoperoxidasa

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

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

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

2.3.4.2.- Valoración semicuantitativa

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

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

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

3.- OTRAS DETERMINACIONES

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

3.1.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS

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

3.2.- DETERMINACIONES SEROLÓGICAS Y VÍRICAS

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

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

4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.1.- ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

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

4.2.- ESTADÍSTICA ANALÍTICA

Para el estudio estadístico de las variables cualitativas se realizó el test exacto de Fisher. El análisis de los niveles de la proteína de la COX-2, de la MMP-2 y MMP-9 se llevó a cabo mediante el test de la "t" de student. Para el análisis de los datos semicuantitativos del análisis inmunohistoquímico, ARNm de la COX-2, concentración de PGE₂ y actividad de la MMP-9 se utilizó el test de la "U" de Mann-Whitney. Para estudiar la correlación entre variables cuantitativas y el nivel de expresión intrahepática de la COX-2 se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, dado el ajuste a una distribución normal de los valores analizados. Un valor de p inferior a 0,05 nos permitió considerar las diferencias obtenidas como estadísticamente significativas.

El análisis estadístico ha sido llevado a cabo de forma informatizada con la versión 10.0 del programa SPSS[®].

RESULTADOS

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

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

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

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

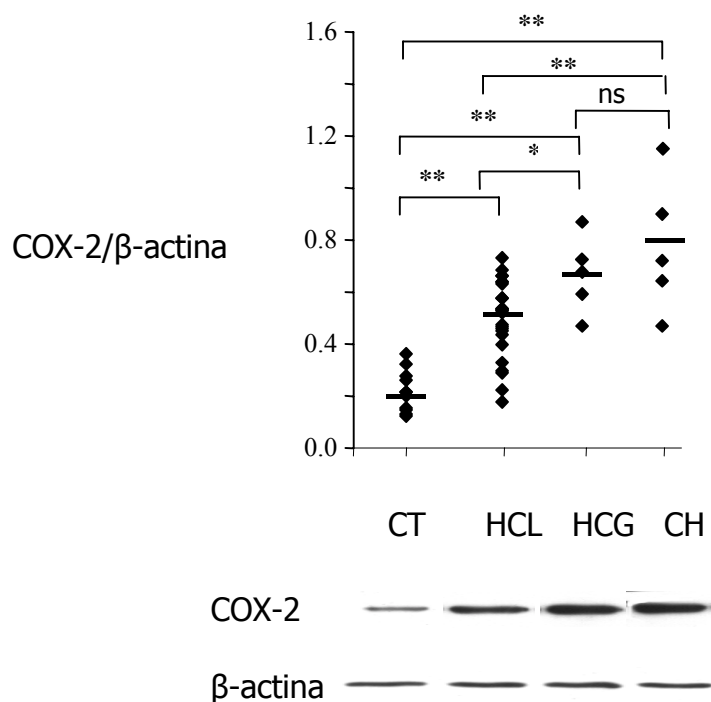


Figura 3

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

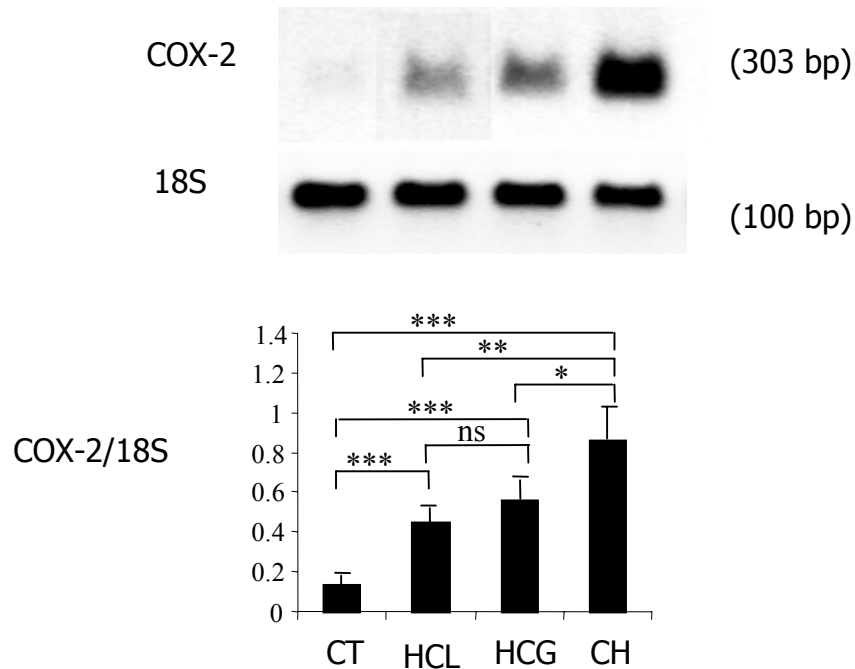


Figura 4

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

1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA COX-2

Para confirmar la funcionalidad de la expresión de la COX-2 se midieron las concentraciones de PGE₂ en muestras representativas de HC por VHC, CH por VHC y del grupo control, detectándose un aumento de su concentración de 1,9 veces y de 3,3 veces, en la HCG y en la CH respectivamente, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (figura 5).

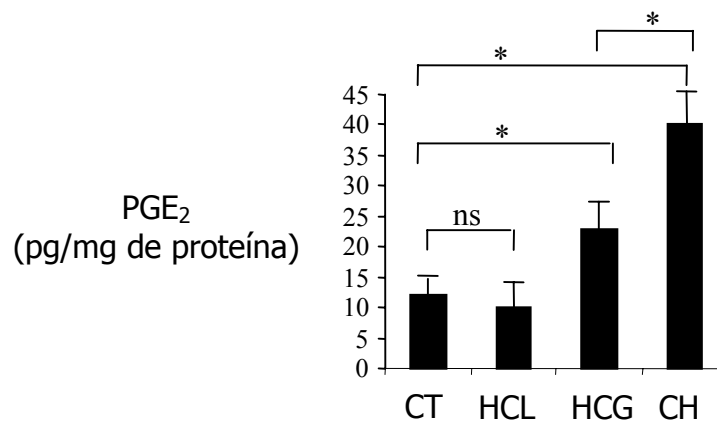


Figura 5

Las concentraciones de PGE₂ se analizaron por ELISA. Los resultados se presentan como su media y desviación estándar. Las diferencias en las concentraciones de PGE₂ entre el grupo control (CT: 12 ± 2 pg/mg) respecto a la HCG (23 ± 4 pg/mg) y la CH (40 ± 5 pg/mg) fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001^*$), al igual que entre la HCG y la CH ($p < 0,001^*$).

1.3.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

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

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

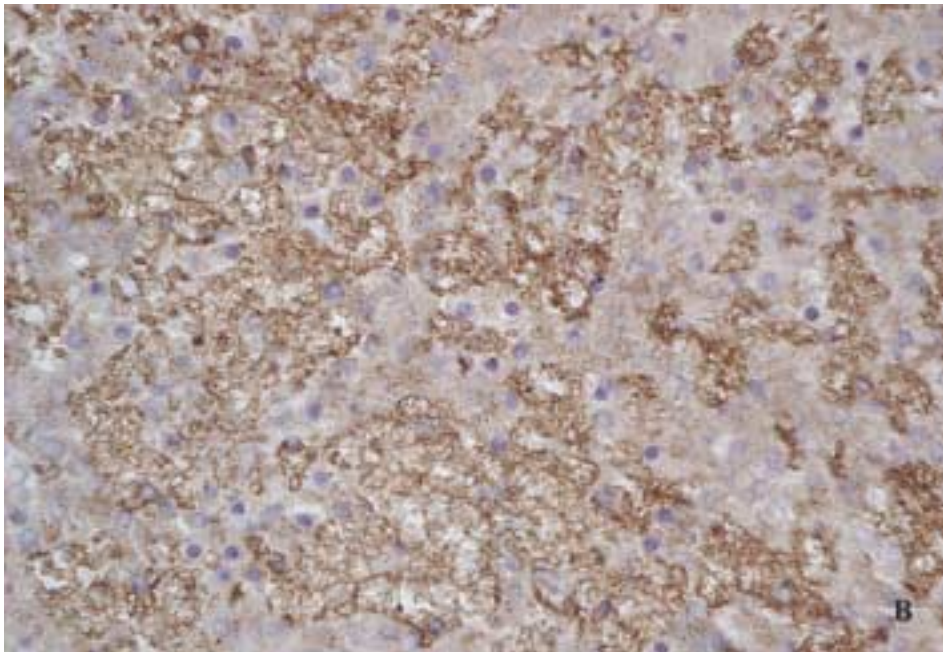
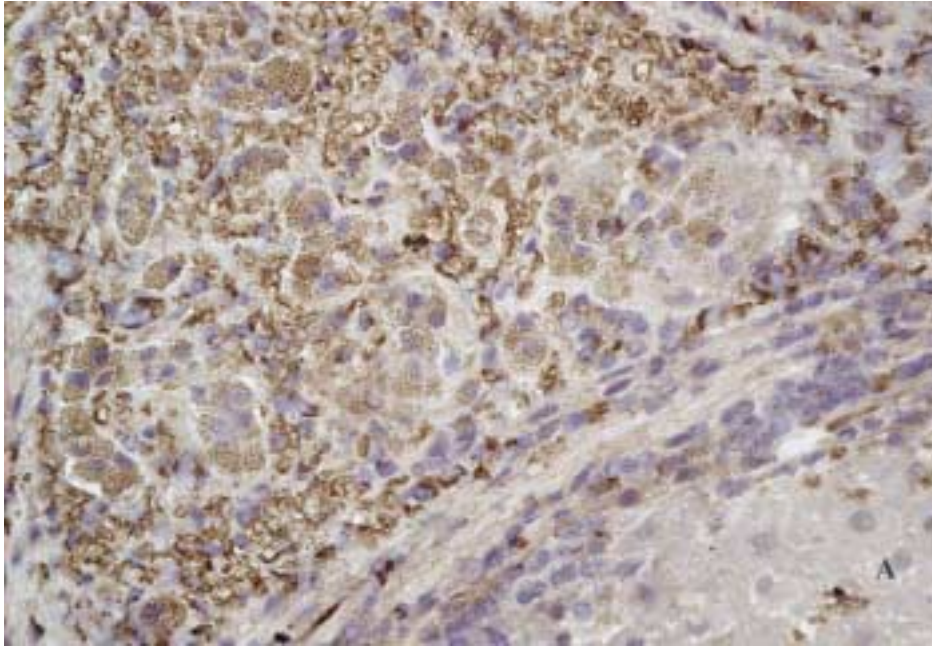


Figura 6 (Paneles A y B).

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

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

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

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

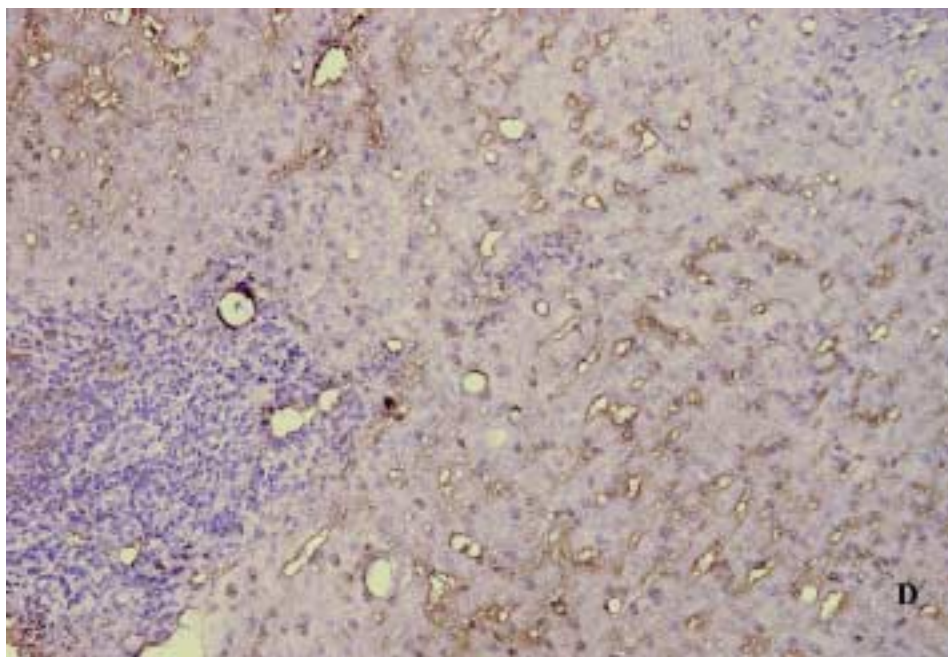
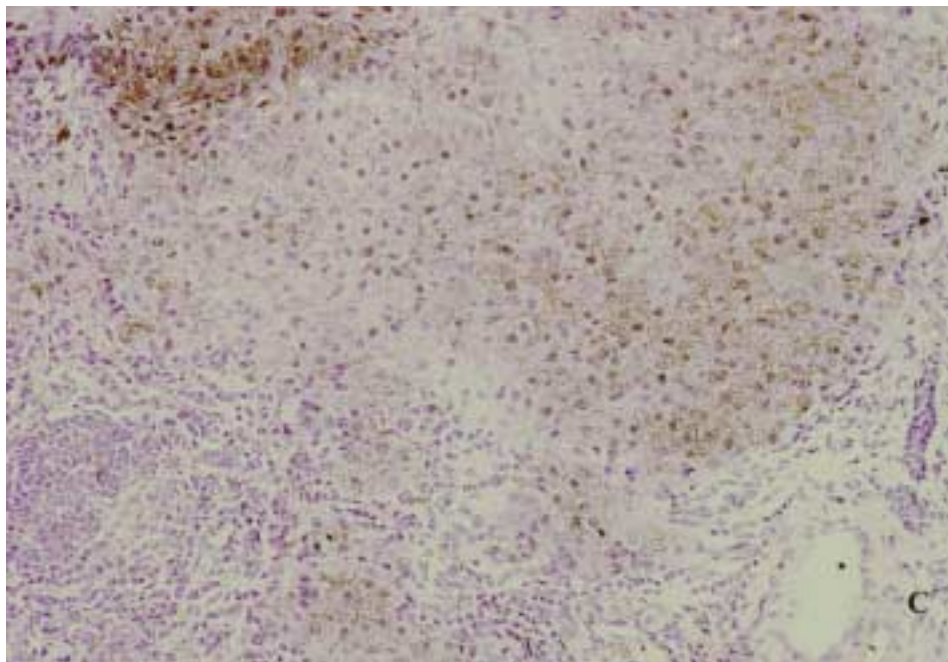


Figura 6 (Paneles C y D).

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

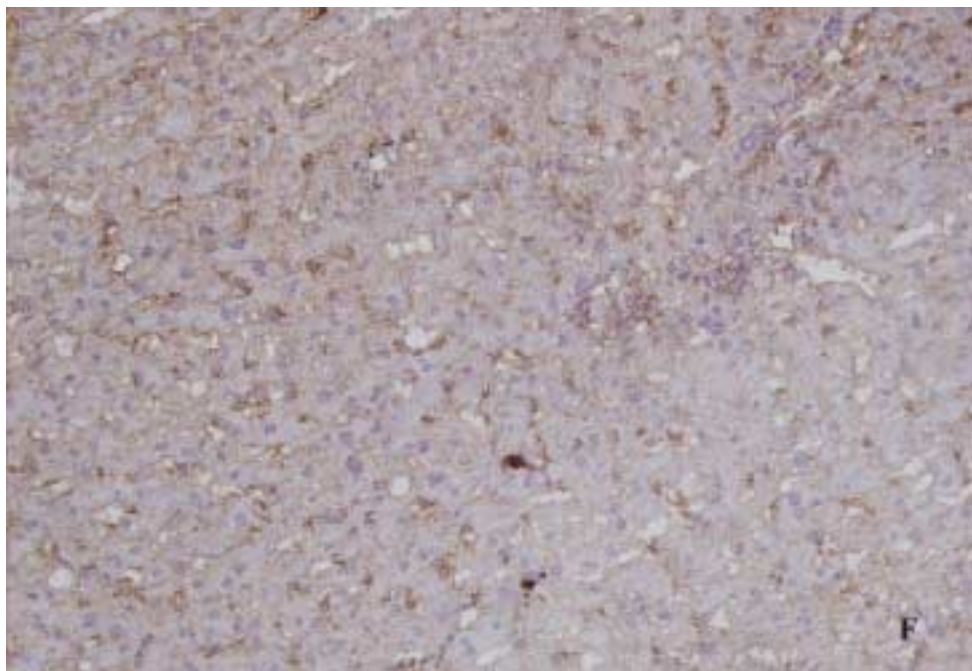
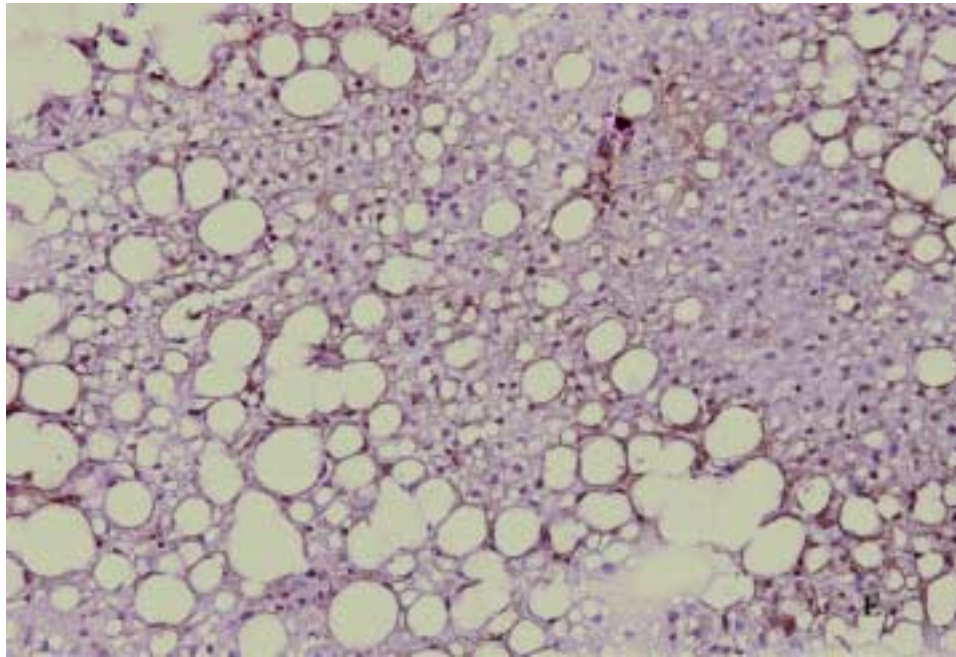


Figura 6 (Paneles E y F).

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

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

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

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

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

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

Puntuación de la COX-2

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

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

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

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

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

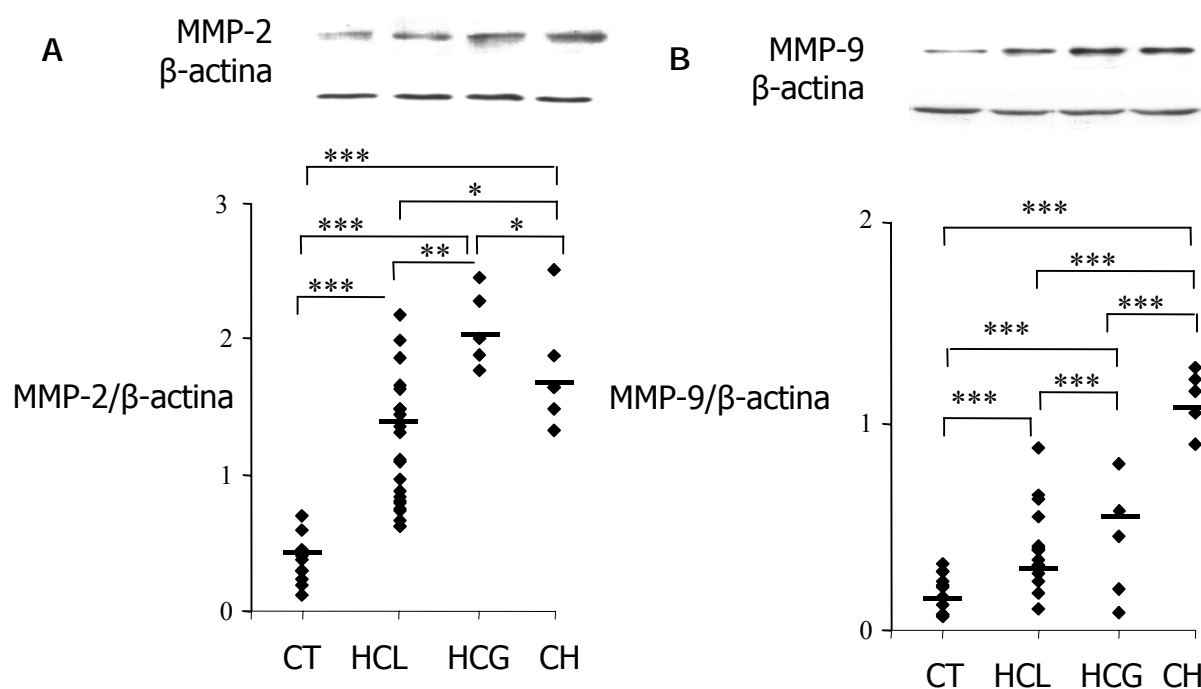


Figura 7

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

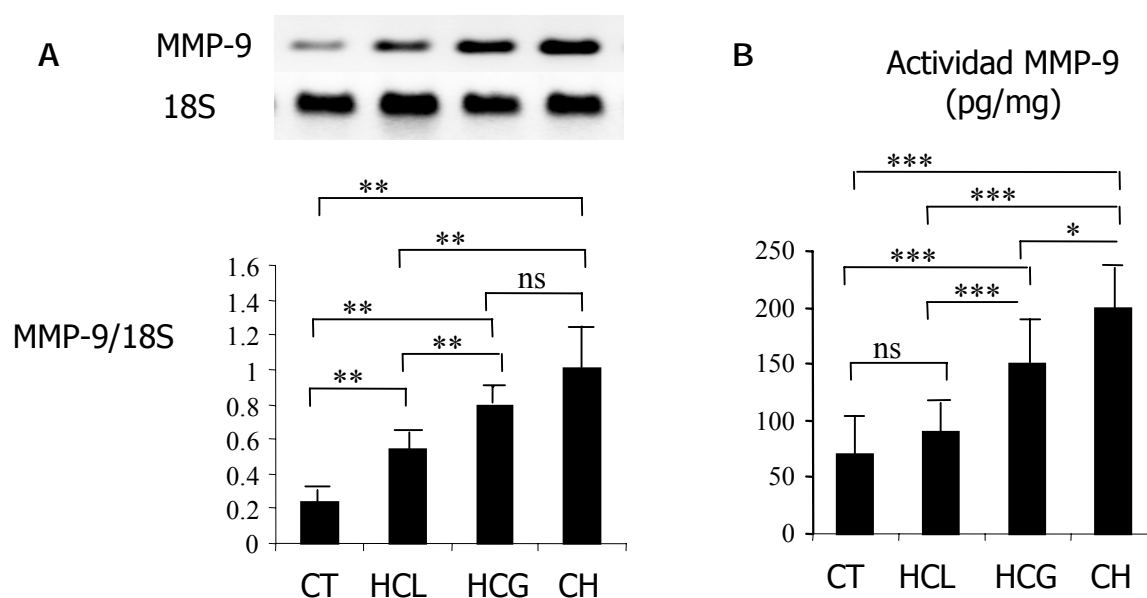


Figura 8

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

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

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

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

TABLA 6

Características pacientes con HC por el VHC

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

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

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

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

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

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

DISCUSIÓN

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

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

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

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

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

hepática por el VHC, como son la HCG y la CH. Un hecho a destacar es que la expresión hepatocelular de la COX-2 es funcional, como lo demuestra que las concentraciones intrahepáticas de PGE2 eran más altas en los grupos con mayor expresión hepatocelular de la COX-2.

Se ha implicado a la COX-2 en la patogenia del CHC, y especialmente, en los mecanismos de iniciación y mantenimiento del crecimiento y supervivencia de las células tumorales, en la inducción de angiogénesis vía factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), en la inhibición de la vía apoptótica y en el aumento de la adhesión a la MEC de las células que sobre-expresaban la COX-2 (147-150,152-156). Análisis mediante arrays de cADN revelaron que la transformación celular provocada por la COX-2 está acompañada por cambios en la expresión de varios genes relacionados con la proliferación, la morfología, la adhesión y el ciclo celular (181). Estudios experimentales con muestras de tejido hepático de pacientes sometidos a resección de CHC han demostrado un papel importante de la COX-2 en los estadios iniciales de la hepatocarcinogénesis y en la desdiferenciación de estas células (160-162).

En este trabajo de Tesis Doctoral se demuestra la existencia de una intensa expresión hepatocelular de la COX-2 en la CH terminal, lesión claramente premaligna, lo que sugiere que esta enzima podría jugar un importante papel en la patogenia del CHC. Un hallazgo interesante es que el patrón de expresión intrahepático de la COX-2 en la CH alcohólica fue similar al de la CH por el VHC, hecho no descrito previamente en pacientes con

hepatopatía alcohólica, pero en consonancia con lo observado en modelos de lesión alcohólica hepática en ratas (133-135). Si bien parece existir una mayor expresión desde el punto de vista semicuantitativo en la infección crónica por el VHC respecto a la etiología alcohólica, esto pudiera estar en relación con los resultados obtenidos, en estudios realizados por nuestro grupo, en los que se demuestra en cultivos celulares de hepatocitos que la transfección de la parte del genoma del VHC que codifica la proteína del core y la NS-5 inducen la expresión de la COX-2, siendo esta mayor al estimular las células con diferentes citoquinas (datos enviados pendientes de publicación). Basado en estos resultados, es concebible que las PG producidas por los hepatocitos de pacientes con una infección crónica por VHC o con un consumo crónico de alcohol pudieran actuar de forma autocrina, a través de receptores PPAR, y/o paracrina, uniéndose a receptores EP, en la carcinogénesis hepática. Estos hallazgos experimentales aportan una base racional para el uso de inhibidores selectivos de la COX-2 para la quimioprevención del CHC en pacientes con CH.

Las enzimas proteolíticas conocidas como metaloproteinasas (MMPs) juegan un papel central en la migración celular mediante la degradación de componentes celulares y extracelulares de la MEC en la invasión tumoral, la morfogénesis, el desarrollo embriológico de órganos y el daño tisular (182,183). La importancia de las MMPs en la remodelación de la MEC hepática puede deducirse de la observación que durante la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial, los precursores de MMP-2 y MMP-9 se activan y contribuyen a la proliferación hepatocitaria (184). Además se ha demostrado la

asociación entre la fibrosis hepática y el aumento de la expresión intrahepática de MMPs durante la infección crónica por el VHC (103) y que la COX-2 promueve la liberación de MMP-2 y MMP-9 en hepatocitos fetales de rata en un modelo de remodelación de la MEC durante la transición fetal-neonatal (125). En relación con estos resultados, Lara-Pezzi y cols (158) demostraron que la proteína X del VHB promovía la invasión de células tumorales mediante la inducción de metaloproteinasas de membrana tipo I a través de la activación de la COX-2.

Nuestros datos muestran un aumento progresivo de las proteínas MMP-2 y MMP-9 en el hígado de los pacientes con HC y CH por el VHC de una forma paralela a los incrementos observados en la expresión hepatocelular de la COX-2, lo que sugiere una relación funcional entre la expresión de la COX-2 y la activación de MMPs en la infección crónica por el VHC.

En contraposición a otros estudios previos en HC víricas, en los cuales se había demostrado una relación del grado de expresión de la COX-2 con variables como el nivel de transaminasas (137,164), en nuestro estudio no encontramos relación de los niveles de COX-2 con variables clínicas o de laboratorio de los pacientes. En relación con los parámetros histológicos no demostramos relación con el grado necroinflamatorio y los niveles de COX-2, pero si determinamos una asociación con el estadio de fibrosis hepática, de forma similar a otro estudio previo (137).

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral indican una clara relación de la COX-2 con la fibrosis hepática, y suponen, por tanto, una base racional que apoya el potencial beneficio de los inhibidores selectivos de la COX-2 junto a fármacos antivíricos en la prevención y tratamiento de la fibrosis hepática en la infección crónica por el VHC.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo de Tesis Doctoral son:

1. La enzima COX-2 se expresa en el hígado de pacientes con infección crónica por el VHC.
2. La expresión de la COX-2 aumenta de forma progresiva en relación con la gravedad de la lesión hepática, observándose la máxima expresión en la CH por el VHC.
3. Este incremento de la expresión de la COX-2 en la infección crónica por el VHC, se acompaña de un aumento de la concentración intrahepática de PG.
4. El aumento de la expresión de la COX-2 se localiza principalmente a nivel del citoplasma de los hepatocitos en la HCG y la CH por el VHC, mientras que en la HCL se localiza fundamentalmente en células mononucleares y del endotelio vascular sinusoidal.
5. El nivel de expresión de la COX-2 y su localización intrahepática es similar en los pacientes con CH por el VHC y por consumo de alcohol.
6. El nivel de expresión de la MMP-2 y la MMP-9 en el hígado de los pacientes con infección crónica por el VHC aumenta en relación con la gravedad de la lesión hepática, siendo máximo en la CH.

7. En la infección crónica por el VHC, existe una estrecha relación entre el nivel de expresión intrahepático de la COX-2 y el de la MMP-2 y la MMP-9.

8. Se demuestra una asociación positiva entre la presencia y gravedad de la fibrosis hepática con los niveles de expresión de la COX-2.

RESUMEN

La COX es la enzima encargada de la biosíntesis de las PG. Su isoforma inducible, denominada COX-2, ha sido implicada en múltiples procesos patológicos como inflamación, fibrogénesis y carcinogénesis. Diferentes autores han descrito que el aumento de la expresión intrahepática de la COX-2 y de la producción de PG podría contribuir a la lesión hepática y a la aparición de CHC. En nuestro medio la infección por el VHC es una causa importante de HC, CH y CHC, y por tanto de una morbi-mortalidad significativa.

Los objetivos principales de este trabajo de Tesis Doctoral han sido valorar la expresión y localización de la COX-2 en la HC por VHC y su relación con la gravedad de la lesión hepática. Otros objetivos analizados han sido comparar la expresión de la COX-2 en la HC por VHC con la hepatopatía alcohólica, la expresión y relación de las MMPs con la COX-2, en la infección crónica por el VHC, y la valoración de la asociación entre los niveles de expresión intrahepática de la COX-2 con las características clínicas, bioquímicas, virológicas e histológicas de los pacientes con infección crónica por el VHC.

Se han estudiado 51 pacientes, de los cuales 32 tenían una infección crónica por el VHC (5 con CH), 9 una hepatopatía alcohólica (6 con CH) y 10 pacientes como grupo control compuesto de 4 pacientes con hígado histológicamente normal y 6 con esteatosis hepática no alcohólica. Para determinar la COX-2 en muestras de tejido hepático se realizaron técnicas de Western Blot, RT-PCR y de inmunohistoquímica. Además se determinó la producción de PG por técnicas de ELISA para valorar la funcionalidad de la

enzima. También se estudió mediante Western Blot la expresión intrahepática de MMP-2 y MMP-9 y la actividad de la MMP-9 con un ensayo específico.

El análisis por Western Blot de la COX-2 en muestras de biopsia hepática de pacientes con infección crónica por el VHC demostró un aumento significativo de su expresión en todos los grupos histológicos estudiados respecto al grupo control. Hay que destacar el hecho del incremento progresivo de los niveles de expresión intrahepática de la COX-2 en relación con la gravedad de la lesión histológica, presentando el mayor grado de expresión en la CH. La determinación del ARNm de la COX-2 por RT-PCR confirmó el patrón de expresión observado a nivel de la proteína. Este incremento de la expresión de la COX-2 se acompañó de un aumento de la concentración intrahepática de PG, que fue máxima en la HCG y en la CH, lo que demuestra que la expresión intrahepática de la COX-2 es funcional en estos pacientes. Posteriormente se procedió a valorar mediante estudio inmunohistoquímico la localización intrahepática de la COX-2. De esta manera se observó que la COX-2 se expresaba en el citoplasma de hepatocitos en la HCG y en la CH por el VHC, mientras que en la HCL por el VHC, en la esteatosis alcohólica y en el grupo control la expresión de la COX-2 se restringía a las células mononucleares y del endotelio sinusoidal. Un hecho interesante es que el patrón de expresión intrahepático de la COX-2 fue similar en la CH tanto de etiología vírica como alcohólica.

Uno de los datos más interesante de este trabajo de Tesis Doctoral fue que el nivel de expresión intrahepático de las MMP-2 y MMP-9, así como la actividad intrahepática de MMP-9, estaban significativamente aumentadas en los pacientes con infección crónica por el VHC respecto al grupo control, mostrando una correlación positiva con la gravedad del daño hepático, y de forma paralela al patrón de expresión intrahepático de la COX-2 en estos pacientes.

No se demostró relación entre los niveles de expresión intrahepático de COX-2 con la edad y el sexo de los pacientes, los niveles de transaminasas, el genotipo y carga virales, ni con el grado necroinflamatorio en la biopsia hepática. Por el contrario, se determinó una asociación de los niveles de expresión intrahepática de la COX-2 con el estadio de fibrosis hepática.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que la COX-2, mediante la producción intrahepática mantenida de cantidades significativamente elevadas de PG y de la MMP-2 y MMP-9, juega un importante papel en la fibrogénesis y, probablemente, en la carcinogénesis hepática relacionada con la infección crónica por el VHC.

BIBLIOGRAFIA

1. Sánchez-Tapias JM. Hepatitis Crónica. En: C. Rozman, editor .Medicina Interna, Vol. 1, 12º edición. Doyma S.A., Barcelona 1992;302-5.
2. Arroyo V, Ginés P. Cirrosis hepática. En: C. Rozman, editor. Medicina Interna, Vol. 1, 12º edición. Ediciones Doyma, Barcelona 1992;305-9.
3. Ampurdanés S, Bruguera M. Cirrosis hepática compensada. En: Berenguer J, Berenguer M, Ponce J, Prieto M, Sala T (Eds). Gastroenterología y Hepatología, 3º edición. Ediciones Elsevier Science, Barcelona 2002;643-7.
4. Alter MJ. Epidemiology and prevention of hepatitis B. Semin Liver Dis 2003;23:39-46.
5. Enríquez J, Gallego A, Torras J. Epidemiología del virus B de la hepatitis. En: Carreño V, Castillo I (Eds). Hepatitis víricas. Biología, clínica y tratamiento. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 2001;143-50.
6. Nanji AA, Zakim D. Alcoholic liver disease. En: Zakim D, Boyer TD (Eds.). Hepatology. A textbook of liver disease. Third edition. WB Saunders Company, Philadelphia 1996;891-62.
7. Salaspuro M. Aspectos epidemiológicos de la hepatopatía alcohólica, metabolismo del etanol y patogenia de las lesiones hepáticas por el alcohol. En: Rodés J, Benhamon J-P, Bircher J, McIntyre N, Rizzetto M, (Eds). Tratado de Hepatología clínica. 2º edición. Masson S.A., Barcelona, 2001;1305-29.
8. McCullough AJ, O'Connor JFB. Alcoholic liver disease: Proposed recommendations for the American College of Gastroenterology. Am J Gastroenterol 1998;93:2022-36.

9. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clinic Proc 1980;55:434-38.
10. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol 2002;17(Suppl):S186-S190.
11. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of non-alcoholic steatosis syndromes. Sem Liver Dis 2001;21:17-26.
12. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Eng J Med 2002;346:1221-31.
13. WHO. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WGO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board. Antwerp, Belgium. J Viral Hepat 1999;6:35-47.
14. Costa A, Pulido F. Epidemiología. En: Berenguer J, López JC, Clemente G, (Eds). Hepatitis C en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Ergón S.A., Madrid 2002;53-65.
15. Yen T, Keeffe EB, Ahmed A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. J Clin Gastroenterol 2003;36:47-53.
16. Bellentani S, Pozzato G, Saccoccio G, Crovatto M, Croce LS, Mazzoran L, et al. Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. Gut 1999;44:874-80.

17. Sacristán B, Castañares MJ, Elena A, Sacristán M, Barcenilla J, García JC, et al. Infección por el virus de la hepatitis C en la población general de la Rioja. *Med Clin (Barc)* 1996;107:331-5.
18. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty MC, Nelson KE. Viral infection in short-term injection drug users: the prevalence of hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Public Health* 1996;86:655-61.
20. WHO. Hepatitis C. Fact Sheet No. 164. October 2000.
21. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996;334:1685-90.
22. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis-associated diseases in United States in 1997. *Semin Dial* 2000;13:75-85.
23. Pereira BJ, Mildford EL, Kirkman RL, Levey AS. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 1991;325:454-60.
24. Pereira BJ, Wright TL, Schmid CH, Levey AS. A controlled study of hepatitis C transmission by organ transplantation. The New England Organ Bank Hepatitis C Study Group. *Lancet* 1995;345:484-7.
25. Puro V, Petrosilo N, Ippolito G. Italian study group on occupational risk of HIV and other bloodborne infections. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. *Am J Infect Control* 1995;23:273-7.

26. Olmsted RN. What is the risk of acquiring hepatitis C for health care workers and what are the recommendations for prophylaxis and follow-up after occupational exposure to hepatitis C virus? *Am J Infect Control* 1996;24:411-5.
27. Failde I, López FJ, Córdoba JA, Zarzuela M, Benitez E, Senabre V. Evolution and factors associated with biological-risk accidents reported in a university hospital in Spain, 1989-1995. *Clin Perform Qual Health Care* 1998;6:103-08.
28. Alter HJ, Bradley DW. Non-A, non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus (non-ABC). *Semin Liver Dis* 1995;15:110-20.
29. Diaz V, de la Mata M, Costan G, Montero J, Montero JL, Miño G. Baja prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en parejas heterosexuales estables. *Gastroenterol Hepatol* 1995;18:111-3.
30. Dienstag JL. Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:66S-70S.
31. Zylberberg H, Thiers V, Lagorce D, Squadrito G, Leone F, Berthelot P, et al. Epidemiology and virological analysis of couples infected with hepatitis C virus. *Gut* 1999;45:112-6.
32. Conte D, Franquelli M, Prati D, Colucci A, Minola E. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HVC) infection and rate of HCV transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology* 2000;31:751-5.

33. Centres for Diseases Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus infection and HCV-related chronic disease. *MMWR Morb Mort Wkly Rep* 1998;47(RR19):1-39.
34. Thomas DL, Villano SA, Riester KA, Hershow R, Mofenson LM, Landesman SH, et al. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infection mothers. *J Infect Dis* 1998;177:1480-88.
35. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
36. Diago M, Zapater R, Tuset C, Carbonell P, González C, Cors R, et al. Improbable transmisión intrafamiliar del virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 1995;25:125-8.
37. Sartori M, La Terra G, Aglietta M, Manzin A, Navino C, Verzetti G. Transmission of hepatitis C via blood splash into conjunctiva. *Scand J Infect Dis* 1993;25:270-1.
38. Bronowicki JP, Venard V, Botte C, Monhoven N, Gastin I, Chone L, et al. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997;337:237-40.
39. Hoofnagle JH, Carithers RL, Shapiro C, Ascher N. Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 1995;21:240-52.
40. Puoti M, Zonaro A, Ravaggi A, Martin MG, Castelnuovo F, Cariani E. Hepatitis C virus RNA and antibody response in the clinical course of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992;16:877-81.

41. Hino K, Sainokami S, Shimoda K, Niwa H, Iino S. Clinical course of acute hepatitis C and changes in HCV markers. *Dig Dis Sci* 1994;39:19-27.
42. Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(Suppl 1):21S-28S.
43. Alter MJ, Knyszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341:556-62.
44. Bellentani S, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lessons from the Dionysos study. *J Hepatol* 2001;35:531-7.
45. Kenny-Walsh E, for the Irish Hepatology Research Group. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med* 1999;340:1228-33.
46. Howell C, Jeffers L, Hoofnagle JH. Hepatitis C in African Americans. Summary of a workshop. *Gastroenterology* 2000;119:1385-96.
47. Gerlach JT, Zachoval R, Gruener NH, Jung M-C, Ulsenheimer A, Schraut W, et al. Acute hepatitis C: natural course and response to antiviral treatment. *Hepatology* 2001;34:341A.
48. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U, for the East German Hepatitis C Study Group. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology* 2000;32:91-6.
49. Christie JM, Healey CJ, Watson J, Wong VS, Duddridge M, Snowden N, et al. Clinical outcome of hypogammaglobulinemic patients following an

- outbreak of acute hepatitis C: 2 year follow up. *Clin Exp Immunol* 1997;110:4-8.
50. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral and environmental factors. *JAMA* 2000;284:450-56.
51. Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P, et al. Hepatitis C viremia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* 1992;340:697-98.
52. Shakil AO, Conry-Cantelina C, Alter HJ, Hayashi P, Kleiner DE, Tedeschi V, et al. Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic and histologic features. *Ann Intern Med* 1995;123:330-37.
53. Jamal MM, Soni A, Quinn PG, Wheeler DE, Arora S, Johnston DE. Clinical features of hepatitis C-infected patients with persistently normal alanine transaminase levels in the Southwestern United States. *Hepatology* 1999;30:1307-11.
54. Mathurin P, Mousalli J, Cadranel JF, Thibault V, Charlotte F, Dumouchel P, et al. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology* 1998;27:868-72.
55. Persico M, Persico E, Suozzo R, Conte S, De Seta M, Coppola L, et al. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 2000;118:760-64.
56. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36 (Suppl 1):S35-S46.

57. Freeman AJ, Dore GJ, Low MG, Thorpe M, Van Overhede J, Lloyd AR, et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:809-16.
58. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002;36 (Suppl 1):S47-S56.
59. Zoli M, Magalotti D, Bianchi G, Gueli C, Marchesini G, Pisi E. Efficacy of a surveillance program for early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1996;78:977-85.
60. Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, Farmachidi JP, Degott C, Guettier C, et al. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut* 2000;47:131-36.
61. Tarao K, Rino Y, Ohkawa S, Shimizu A, Tamai S, Miyakawa K, et al. Association between high serum alanine aminotransferase levels and more rapid development and higher rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis. *Cancer* 1999;86:589-95.
62. Kronenberger B, Ruster B, Lee JH, Sarrazin C, Roth WK, Herrmann G, et al. Hepatocellular proliferation in patients with chronic hepatitis C and persistently normal or abnormal aminotransferase levels. *J Hepatol* 2000;33:640-47.
63. Willson RA. Extrahepatic manifestations of chronic viral hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:4-17.
64. Czaja AJ. Autoimmune hepatitis and viral infection. *Gastroenterol Clin North Am* 1994;23:547-66.

65. Johnson JR, Willson R, Yamabe H, Couser W, Alpers CE, Wener MH, et al. Renal manifestations of hepatitis C virus infection. *Kidney Int* 1994;46:1255-63.
66. Gasparoto D, De Re V, Boiocchi M. Hepatitis C virus, B-cell proliferation and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2002;43:747-51.
67. Dammacco F, Sansonno D, Piccoli C, Racanelli V, D'Amore FP, Lauletta G. The lymphoid system in hepatitis C virus infection: autoimmunity, mixed cryoglobulinemia, and overt B-cell malignancy. *Semin Liver Dis* 2000;20:143-57.
68. Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: The Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000;31:241-6.
69. Goodman Z, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis* 1995;15:70-81.
70. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-35.
71. Ishak KG. Chronic hepatitis: morphology and nomenclature. *Mod Pathol* 1994;7:690-713.
72. Ishak KG, Baptista A, Bianchi L, Callea F, DeGroot J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-99.

73. Bedossa P, Poynard T and the French METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;24:289-93.
74. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372-374.
75. Hubscher SG. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. *J Hepatol* 1998;29:1015-22.
76. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1409-17.
77. Ludwig J. The nomenclature of chronic active hepatitis: an obituary. *Gastroenterology* 1993;105:274-78.
78. García Monzón C. Hepatitis víricas. *Medicine* 2000;8:665-8.
79. Moreno Otero R, García Buey L, García Monzón C. Patogenia de la lesión hepática por el virus C de la hepatitis. En: Carreño V, Castillo I (Eds). *Hepatitis víricas. Biología, clínica y tratamiento*. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 2001;143-50.
80. Berg EL, Goldstein LA, Jutila MA, Nakache M, Picker LJ, Streeter PR, et al. Homing receptors and vascular addressing: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev* 1989;108:1-16.
81. García-Monzón C, Moreno-Otero R, García-Buey L, García-Sánchez A, Campanero MR, Sánchez-Madrid F. Intrahepatic up-regulated expression of extracellular matrix protein receptors in chronic active hepatitis type B. *Gastroenterology* 1992;102:255-62.

82. García-Monzón C, Sánchez-Madrid F, García-Buey L, García-Arroyo A, García-Sánchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: Evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995;108:231-41.
83. García-Monzón C, García-Buey L, García-Sánchez A, Pajares JM, Moreno-Otero R. Down regulation of intercellular adhesion molecule-1 on hepatocytes in viral chronic hepatitis treated with interferon alfa-2b. *Gastroenterology* 1993;105:462-9.
84. González-Amaro R, García-Monzón C, García-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yague E, et al. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med* 1994;179:841-8.
85. Majano PL, García-Monzón C, López-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernández-Ruiz E, García-Iglesias C, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation. *J Clin Invest* 1998;101:1343-52.
86. Lo Iacono O, García-Monzón C, Almasio P, García-Buey L, Craxi A, Moreno-Otero R. Soluble adhesion molecules correlate with live inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C treated with interferon-alpha. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:1091-9.
87. Bissell DM, Maher JJ. Hepatic fibrosis and cirrhosis. En: Zakim D, Boyer TD (Eds.). *Hepatology. A textbook of liver disease*. Third edition. WB Saunders Company, Philadelphia 1996;506-25.
88. Solís-Herruzo JA. Factores involucrados en la fibrogénesis hepática. *Gastroenterol Hepatol* 2000;23:186-99.

89. Pinzani M, Carloni V. Role of extracellular matrix and extracellular matrix receptors in regulating fibrogenesis: Targets for novel therapies. En: Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Rodés J (Eds). Therapy in liver diseases. The pathophysiological basis of therapy. Masson S.A., Barcelona 1997;185-94.
90. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 2003;200:504-15.
91. Solís-Herruzo, JA. Fibrosis hepática. En: Berenguer J, Berenguer M, Ponce J, Prieto M, Sala T (Eds). Gastroenterología y Hepatología, 3^o edición. Ediciones Elsevier Science, Barcelona 2002;576-84.
92. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-72.
93. Bissell DM. Wound repair and hepatic fibrosis: An overview of the biology and treatment. En: Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Rodés J (Eds). Therapy in liver diseases. The pathophysiological basis of therapy. Masson S.A., Barcelona 1997;157-61.
94. Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38:S38-S53.
95. Britton RS, Bacon BR. Retinoids and oxyradicals in fibrogenesis: Therapeutic implications. En: Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Rodés J (Eds). Therapy in liver diseases. The pathophysiological basis of therapy. Masson S.A., Barcelona 1997;163-71.
96. Tsukamoto H, Lin M, Pham TV, Nanji A, Fong TL. Role of inflammation in liver fibrogenesis. En: Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Rodés J (Eds).

- Therapy in liver diseases. The pathophysiological basis of therapy. Masson S.A., Barcelona 1997;173-78.
97. Rockey DC. Cytokine regulation of hepatic fibrogenesis. En: Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Rodés J (Eds). Therapy in liver diseases. The pathophysiological basis of therapy. Masson S.A., Barcelona 1997;179-84.
98. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-50.
99. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology* 2001;34:859-67.
100. Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* 2003;37:4-12.
101. Benyon RC, Arthur MJP. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-84.
102. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Oshita M, Katayama K, Kato M, et al. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1997;26:574-83.
103. Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Bahr M, Flemming P, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:239-47.

104. Lichtinghagen R, Steinmetz C, Pehle B, Breitenstein K, Seifert T, Boeker KHW. Matrix metalloproteinases in liver and serum in chronic active hepatitis C and HCV-induced cirrhosis. *Hepatol Res* 1999;14:119-34.
105. Wang XW, Hussain SP, Huo T-I, Wu C-G, Forgues M, Hofseth LJ, et al. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002;181-182:43-7.
106. Tannapfel A, Wittekind C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Arch* 2002;440:345-52.
107. Colombo M. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999;19:263-9.
108. Esplugues JV. Mediadores celulares II. Eicosanoides. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A (Eds.). *Farmacología humana*. 2ª edición. Masson-Salvat Medicina, Barcelona 1992;289-99.
109. Williams CS, Dubois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am J Physiol* 1996;270:G393-G400.
110. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte LBA, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12:1063-73.
111. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.
112. Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2 – 10 years later. *JPET* 2002;300:367-75.

113. Eberhart CE, Dubois RN. Eicosanoids and gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995;109:285-301.
114. Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:1178-82.
115. Feng L, Xia Y, García GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in Cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995; 95: 1669-75.
116. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 1993; 268(12): 9049-54.
117. Smith WI, Garavito RM, DeWitt DI. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271(52):33157-60.
118. D'Acquisto F, Iuvone T, Rombolá L, Sautebin L, Di Rosa M, Carnuccio R. Involvement of NF- κ B in the regulated of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS letters* 1997;418:175-8.
119. D'Acquisto F, Lanzotti V, Carnuccio R. Cyclolinteinone, a sesterterpene from sponge *Cacospongia linteiformis*, prevents inducible nitric oxide synthase and inducible cyclo-oxygenase protein expression by blocking nuclear factor- κ B activation in J774 macrophages. *Biochem J* 2000;346: 793-8.

120. Callejas NA, Casado M, Boscá, Martín-Sanz P. Requirement of nuclear factor kB for the constitutive expression of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 in rat trophoblasts. *J Cell Sci* 1999;112:3147-55.
121. Johnston DE, Kroening C. Stimulation of prostaglandin synthesis in cultured liver cells by CCl₄. *Hepatology* 1996;24:677-84.
122. Callejas NA, Boscá L, Williams CS, DuBois RN, Martín-Sanz P. Regulation of cyclooxygenase 2 expression in hepatocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Gastroenterology* 2000;119:493-501.
123. Tsujii H, Okamoto Y, Kikuchi E, Matsumoto M, Nakano H. Prostaglandin E₂ and rat liver regeneration. *Gastroenterology* 1993;105:495-9.
124. Adachi T, Nakashima S, Saji S, Nakamura T, Nozawa Y. Roles of prostaglandin production and mitogen-activated protein kinase activation in hepatocyte growth factor-mediated rat hepatocyte proliferation. *Hepatology* 1995;21:1668-74.
125. Callejas NA, Casado M, Díaz-Guerra MJM, Boscá L, Martín-Sanz P. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:860-7.
126. Sitzmann JV, Bulkley GB, Mitchell MC, Campbell K. Role of prostacyclin in the splanchnic hyperemia contributing to portal hypertension. *Ann Surg* 1989;209:322-7.
127. Sitzmann JV, Li SS, Lin PW. Prostacyclin mediates splanchnic vascular response to norepinephrine in portal hypertension. *J Surg Res* 1989;47:208-11.

128. Wu YP, Li SS, Campbell KA, Sitzmann JV. Modulation of splanchnic vascular sensitivity to angiotensina II. *Surgery* 1991;110:162-8.
129. Fernández M, García-Pagán JC, Casadevall M, Mourelle MI, Pique JM, Bosch J, et al. Acute and chronic cyclooxygenase blockage in portal-hypertensive rats: influence in nitric oxide biosynthesis. *Gastroenterology* 1996;110:1529-35.
130. Graupera M, García-Pagán JC, Abraldes JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003;37:172-81.
131. Yokoyama Y, Xu H, Kresge N, Keller S, Sarmadi AH, Baveja R, et al. Role of thromboxane A2 in early BDL-induced portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G453-60.
132. Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* 2003;37:4-12.
133. Nanji AA. Role of Kupffer cells in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002;27:13-5.
134. Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao S, et al. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in rat. *Gastroenterology* 1997;112:943-51.
135. Nanji AA, Zakim D, Rahemtulla, Daly T, Miao L, Zhao S, et al. Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alfa and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. *Hepatology* 1997;26:1538-45.

136. Cheng ASL, Chan HLY, Leung NWY, Liew CT, To KF, Lai PBS, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in chronic hepatitis B and the effects of anti-viral therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:251-60.
137. Cheng J, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, et al. Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A(2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2002;23:185-95.
138. Anderson FH, Zeng L, Yoshida EM, Rock NR. Failure of ketoprofen and interferon combination therapy to improve interferon-resistant chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol* 1997;11:294-7.
139. Zarski JP, Maynard-Muet M, Chousterman S, Baud M, Barnoud R, Abergel A, et al. Tenoxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug, is unable to increase the response rate in patients with chronic hepatitis C treated by alpha interferon. *Hepatology* 1998;27:862-7.
140. Andreone P, Cursaro C, Gasbarrini G. Interferon- α increases E2 production by cultured liver biopsy in patients with chronic viral hepatitis: can non-steroidal anti-inflammatory drugs improve the therapeutic response to interferon? *J Hepatol* 1993;19:228-31.
141. Giambartolomei S, Artini M, Almerighi C, Moavero SM, Levrero M, Balsano C. Nonsteroidal anti-inflammatory drug metabolism potentiates interferon alpha signaling by increasing STAT1 phosphorylation. *Hepatology* 1999;30:510-6.
142. Dapicioglu S, Sari M, Kaynar K, Baki A, Özoran Y. The effect of indomethacin on hepatitis B virus replication in chronic healthy carriers. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:957-9.

143. Denda A, Endoh T, Kitayama W, Tang Q, Noguchi O, Kobayashi Y, et al. Inhibition by piroxicam of oxidative DNA damage, liver cirrhosis and development of enzyme-altered nodules caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Carcinogenesis* 1997;18:1921-30.
144. Denda A, A, Tang Q, Endoh T, Tsujiuchi T, Horiguchi K, Noguchi O, et al. Prevention by acetylsalicylic acid of liver cirrhosis and carcinogenesis as well as generations of 8-hydroxydeoxyguanosine and thiobarbituric acid-reactive substances caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Carcinogenesis* 1994;15:1279-83.
145. Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K-I, Sugita Y, et al. JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology* 2003;125:556-71.
146. Ota S, Bamba H, Kato A, Kawamoto C, Yoshida Y, Fujiwara K. Review article: COX-2, prostanoids and colon cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(Suppl. 2):102-6.
147. Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappiè O, Messerini L, Vannacci A, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001;121:1339-47.
148. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner M, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000;60:1306-11.

149. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105:1589-94.
150. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
151. Tai D, Tsai S, Chen Y, Chuang Y-L, Peng c-Y, Sheen I-S, et al. Activation of nuclear factor kB in hepatitis C virus infection: Implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2000;31:656-64.
152. Hu KQ, Yu CH, Mineyama Y, McCracken JD, Hillebrand DJ, Hasan M. Inhibited proliferation of cyclooxygenase-2 expressing human hepatoma cells by NS-398, a selective COX-2 inhibitor. *Int J Oncol* 2003;22:757-63.
153. Rahman A, Dhar DK, Masunaga R, Yamanoi A, Cono H, Nagasue N. Sulindac and exisulind exhibit a significant antiproliferative effect and induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2000;60:2085-9.
154. Bae SH, Jung ES, Park YM, Kim BS, Kim BK, Kim DG, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1410-1418.
155. Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu B-P, Yue H, Li J-Y, et al. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8(3):483-7.

156. Kern MA, Schubert D, Sahi D, Schöneweiß MM, Moll I, Haugg AM, et al. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Hepatology* 2002; 36: 885-94.
157. Hu K-Q. Rationale and feasibility of chemoprevention of hepatocellular carcinoma by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Lab Clin Med* 2002; 139: 234-243.
158. Lara-Pezzi E, Gómez-Gavero MV, Gálvez BG, Mira E, Iñiguez MA, Fresno M, et al. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002;110:1831-8.
159. Abiru S, Nakao K, Ichikawa T, Migita K, Shigeno M, Sakamoto M, et al. Aspirin and NS-398 inhibit hepatocyte growth factor-induced invasiveness of human hepatoma cells. *Hepatology* 2002;35:1117-24.
160. Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: Relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696.
161. Shiota G, Okubo M, Noumi T, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, et al. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 1999; 46: 407-412.
162. Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Okami J, Ito Y, Shimizu A, et al. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4005-4012.

163. Qiu D-K, Ma X, Peng Y-S, Chen XY. Significance of cyclooxygenase-2 expression in human primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 815-817.
164. Morinaga S, Yamamoto Y, Noguchi Y, Imada T, Rino Y, Akaike M, et al. Cyclooxygenase-2 mRNA is up-regulated in cirrhotic or chronic hepatitis liver adjacent to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1110-1115.
165. Hayashi N, Yamamoto H, Hiraoka N, Dono K, Ito Y, Okami J, et al. Differential expresión of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human bile duct epithelial cells and bile duct neoplasm. *Hepatology* 2001;34:638-50.
166. Yoon J-H, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology* 2002;122:985-93.
167. Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon J-H, bronk SF, Gores GJ. Cox-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2002;35:552-9.
168. Wu T, Han C, Lunz III JG, Michalopoulos G, Shelhamer JG, Demetris AJ. Involvement of 85-kd cytosolic phospholipase A₂ and cyclooxygenase-2 in the proliferation of human cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2002;36:363-73.
169. Endo K, Yoon B-I, Pairojkul C, Demetris AJ, Sirica AE. ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions. *Hepatology* 2002;36:439-50.

170. Chariyalertsak S, Sirikulchayanonta V, Mayer D, Kopp-Schneider A, Fürstenberger G, Marks F, et al. Aberrant cyclooxygenase isozyme expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Gut* 2001;48:80-6.
171. Sirica AE, Lai G-H, Zhang Z. Biliary cancer growth factor pathways, cyclooxygenase-2 and potential therapeutic strategies. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:363-72.
172. Sirica AE, Lai G-H, Endo K, Zhang Z, Yoon B-I. Cyclooxygenase-2 and ERBB-2 in cholangiocarcinoma: potential therapeutics targets. *Semin Liver Dis* 2002;22:303-13.
173. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
174. Burt AD, MacSween RNM. Anatomía patológica de la hepatopatía alcohólica. En: Rodés J, Benhamon J-P, Bircher J, McIntyre N, Rizzetto M. (Eds). *Tratado de Hepatología clínica*. 2º edición. Masson S.A., Barcelona 2001;1331-37.
175. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
176. García-Monzón C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario A, Moreno-Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol* 2000;32:331-8.

177. Young KK, Resnick R, Myers TH. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse-transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* 1993;31:882-6.
178. Koike K, Tsutsuni T, Fugie H, Shintani Y, Moriya K. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002;62:29-37.
179. Rudnick DA, Perlmutter DH, Muglia LJ. Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8885-90.
180. Casado M, Callejas NA, Rodrigo J, Zhao X, Dey SK, Boscá L, et al. Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy. *FASEB J* 2001;15:2016-8.
181. Kamei D, Murakami M, Nakatani Y, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J Biol Chem* 2003;278:19396-405.
182. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991;51(Suppl):5054s-59s.
183. Vaday GG, Lider O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behaviour and inflammation. *J Leukoc Biol* 2000;67:149-59.
184. Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 2000;31:75-82.

ANEXO

Publicaciones en relación con el trabajo de Tesis Doctoral:

1. Oscar Núñez, Amalia Fernández-Martínez, Pedro L. Majano, Arantxa Apolinario, Marta Gómez-Gonzalo, Ignacio Benedicto, Manuel López-Cabrera, Lisardo Boscá, Gerardo Clemente, Carmelo García-Monzón, and Paloma Martín-Sanz. Increased intrahepatic cyclooxygenase-2 expression associates with advanced liver disease in chronic hepatitis C: Role of viral core and NS5A proteins. *Hepatology* (enviado).
2. Oscar Núñez Martínez, Gerardo Clemente Ricote, Carmelo García Monzón. Papel de la ciclooxigenasa-2 en la patogenia de las enfermedades del hígado. *Med Clin (Barc)* 2003; (en prensa)
3. O. Núñez, A. Fernández Martínez, P. Martín Sanz, L. Boscá, A. Apolinario, PL. Majano, L. Santos, M. Salcedo, A. Matilla, D. Rincón, G. Clemente y C. García Monzón. Patrón de expresión intrahepático de la ciclooxigenasa (COX)-2 en distintas hepatopatías crónicas. *Gastroenterol Hepatol* 2003;26(Supl 2):A111.

Comunicaciones a Congresos en relación con el trabajo de Tesis Doctoral:

1. Oscar Núñez, Amalia Fernández-Martínez, Pedro L. Majano, Arantxa Apolinario, Lisardo Boscá, Gerardo Clemente, Paloma Martín-Sanz and Carmelo García-Monzón. Increased intrahepatic cyclooxygenase-2 expression associates with advanced liver disease in chronic hepatitis C: Evidence for a virus-induced gene upregulation. 54th Annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, octubre 2003. *Hepatology* 2003;38(Suppl 1):364A (416).
2. O. Núñez, A. Fernández-Martínez, L. Boscá, A. Apolinario, P. Majano, M. Vega, L. Santos, M. Salcedo, R. Bañares, A. Matilla, D. Rincón, G. Clemente, C. García. Patrón de expresión intrahepático de la ciclooxigenasa-2 en distintas hepatopatías crónicas. LXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Aparato Digestivo. Marbella, junio 2003. *Rev Esp Enferm Dig* 2003;95(Supl 1):29-30 (A C-59).