

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



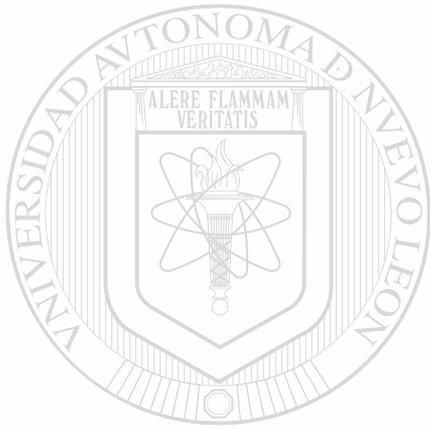
FIBROGENESIS HEPATICA EN LA RECIDIVA C  
POSTRASPLANTE: PAPEL PATOGENICO DEL TGF  $\beta$

POR

LAURA ESTHELA CISNEROS GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN MEDICINA con Especialidad en Hepatología

Octubre 2002



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

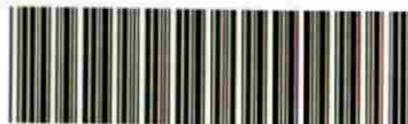
ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

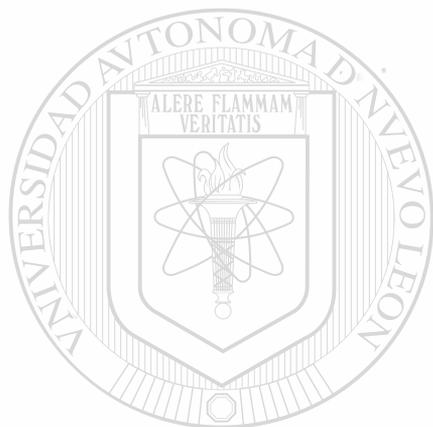
**FIBROGENESIS HEPATICA EN LA RECIDIVA C  
POSTRASPLANTE: PAPEL PATOGENICO DEL TGF  $\beta$**

TD  
RD546  
.C5  
2002  
c.1

2002



1080089558



# UANL

---

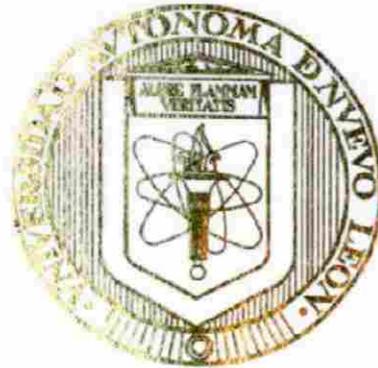
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**FIBROGENESIS HEPATICA Y LA RECIDIVA C POSTRASPLANTE: PAPEL  
DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL TGF $\beta$**

Por

**LAURA ESTHELA CISNEROS GARZA**

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

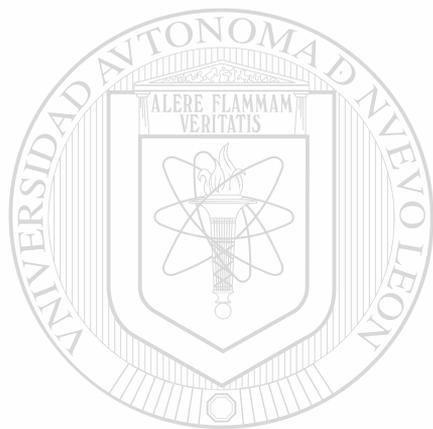
Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN MEDICINA con Especialidad en Hepatología**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Octubre 2002



TD  
RD546  
.C5  
2002



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**FIBROGENESIS HEPATICA EN LA RECIDIVA C POSTRASPLANTE:**

**PAPEL PATOGENICO DEL TGF $\beta$**

**ACEPTADOS**

**Aprobación de la Tesis:**



A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to be "Gustavo...".

**Director de la Tesis**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to be "M. A. ...".

**Co-director de la Tesis**

**FIBROGENESIS HEPATICA EN LA RECIDIVA C POSTRASPLANTE:**

**PAPEL PATOGENICO DEL TGF $\beta$**

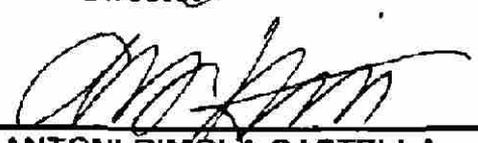
**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. PhD. LINDA ELSA MUÑOZ ESPINOSA**

**Director**



---

**DR. ANTONI RIMOLA CASTELLA**

**Co-Director**



---

**DR. MIGUEL ESCOBEDO VILLARREAL**

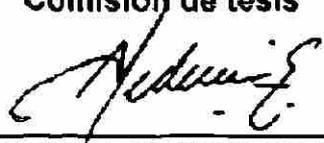
**Comisión de tesis**



---

**DRA. PAULA CORDERO PEREZ**

**Comisión de tesis**



---

**DR. CARLOS E. MEDINA DE LA GARZA**

**Comisión de tesis**

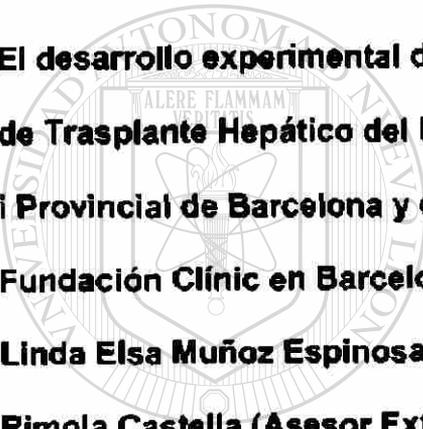


---

**DR. DIONIGIO ANGEL GALARZA DELGADO**

**Subdirector**

**De Investigación y Estudios de Postgrado**



**El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Trasplante Hepático del Institut de Malalties Digestives del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Clínic en Barcelona, España, bajo la asesoría de la Dra. PhD. Linda Elsa Muñoz Espinosa (Asesor Interno) y la co-asesoría del Dr. Antoni Rimola Castella (Asesor Externo)**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza necesaria para seguir adelante y alcanzar una meta tan importante en mi vida.

A mi esposo: **Francisco Javier**, quien en todo momento, me ha dado el apoyo, amor, comprensión, cariño, fuerza y estímulo para seguir adelante, día a día, aún en mis momentos de flaqueza y el haberme permitido continuar y lograr mis metas, apoyándome sin recelo y aguantando mis ausencias en los periodos de capacitación y entrenamiento.

A mis hijos: **Ana Laura y Alejandro**, quienes han tenido que soportar las vicisitudes de una madre estudiante y trabajadora nata, quien no ha tenido la cantidad de tiempo suficiente para compartir con ellos. Sin embargo ellos han sido el principal motivo y la razón de mi lucha constante para seguir adelante.

A mis padres: **Héctor y María Teresa**, quienes gracias a sus enseñanzas, valores y al ejemplo de su constante estudio, trabajo arduo y realización, han sido la columna angular de mi crecimiento y desarrollo, quienes siempre han confiado y apoyado mis decisiones, contribuyendo siempre con su apoyo incondicional.

Al **Dr. Antoni Rimola**, quien ha sido mi gran maestro y asesor, quien no reparó en brindarme todos sus años de experiencia en el Trasplante Hepático, quien me apoyó desde el inicio para lograr la realización del presente trabajo, él es parte fundamental en la historia del trasplante logrando con sus experiencias y estudios contribuir a sentar las bases terapéuticas de la inmunosupresión.

A mis hermanas: **Alejandra y María Teresa**, quienes siempre han apoyado mi desarrollo profesional

A todos y cada uno de mis maestros, que contribuyeron a mi conocimiento actual.

A mi compañera y amiga **Carmen Blasco**, de la Fundación Clínic, quien con su conocimiento, paciencia y dedicación, me introdujo al fascinante mundo de la biología molecular y me apoyó en todo momento para el desarrollo del trabajo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Linda Muñoz**, quien sembró en mí el deseo de poder lograr realizar a la par de mi entrenamiento en Trasplante Hepático, el doctorado en Medicina.

Al **Dr. Rodolfo Gutiérrez Nava**, quien ha sido mi maestro desde la residencia médica, siempre estimuló en mí el continuar mi crecimiento académico y desarrollo profesional.

Al **Dr. Eleazar Hernández**, quien siempre ha sido un apoyo en el área de estadísticas, enseñanza e investigación.

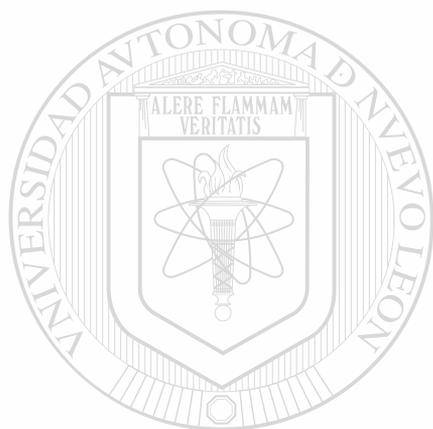
Al **Instituto Mexicano del Seguro Social**, quien facilitó la realización del entrenamiento en el extranjero, lo cual fue base para la consecución de este trabajo.

Al dirección del **Hospital Regional de Especialidades No. 25, IMSS** por el apoyo otorgado para continuar el desarrollo de mi entrenamiento e investigación.

Al grupo de **Radiólogos Intervencionistas y Cirujanos de Hígado** del Hospital Clinic quienes fueron parte fundamental para la obtención de las muestras de biopsia hepática dirigidas por ecografía.

A mi amiga **Carolina Graciela Zamudio** por brindarme siempre su amistad incondicional.

A todo el grupo de médicos que forman parte del Institut de Malalties Digestives en el Hospital Clínic de Barcelona, especialmente en el área de **Hepatología** y el área de **Trasplante Hepático** a quienes con sus enseñanzas diarias, comentarios o sugerencias contribuyeron a mi formación y al desarrollo de ésta meta.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## TABLA DE CONTENIDO

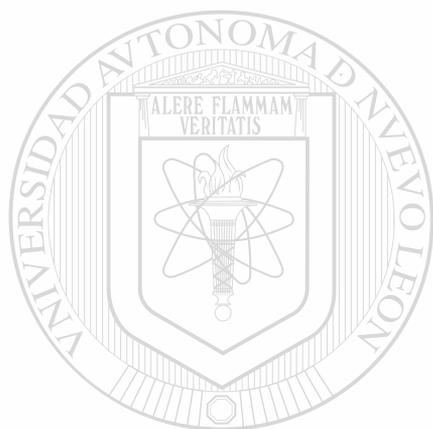
<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>I.-INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.1 Evolución del Trasplante Hepático	1
1.2 Obtención de órganos para Trasplante	7
1.3 Infraestructura de una Unidad de Trasplante	8
1.4 Indicaciones de Trasplante Hepático	9
1.4.1 Colestasis Crónicas	11
1.4.2 Cirrosis de origen no Biliar o de origen hepatocelular	13
1.4.3 Tumores Hepáticos	15
1.4.4 Insuficiencia Hepática Aguda	16
1.4.5 Otras Enfermedades	16
1.5 Contraindicaciones del Trasplante Hepático	19 <sup>®</sup>
1.6 Evaluación de los Candidatos a Trasplante Hepático	23
1.7 Distribución de los órganos para el Trasplante	26
1.7.1 Modelo Organizativo Español	26
1.7.2 Modelo Organizativo Americano	28
1.7.3 Otros modelos Organizativos	30
1.8 Inmunosupresión	31

1.8.1 Ciclosporina	31
1.8.2 Tacrolimus	31
1.8.3 Nuevos Inmunosupresores	33
1.8.3.1 Micofenolato Mofetil	33
1.8.3.2 Sirolimus	33
1.8.3.3 Anticuerpos Monoclonales	34
1.9 Fibrogénesis Hepática y TGFβ	34
1.10 Virus C: Epidemiología	41
1.10.1 Historia Natural VHC	44
1.10.2 Pruebas diagnósticas VHC	44
1.11 Trasplante Hepático y VHC	49
1.11.1 Historia Natural de la Recidiva C Postrasplante	49
1.11.2 Factor Transformante de Crecimiento Beta y Trasplante Hepático	55
<hr/>	
1.12 Planteamiento de Problema	58
1.13 Justificación	58
1.14 Objetivo General	59
1.14.1 Objetivos Específicos	59
1.14.2 Objetivos Secundarios	60
1.15 Hipótesis	60
<b>II.- MATERIALY METODOS</b>	<b>61</b>
2.1 Equipo	61

<b>2.2 Reactivos y Solventes</b>	<b>62</b>
<b>2.3 Material Biológico</b>	<b>63</b>
<b>2.3.1 Biopsia Hepática de pacientes Trasplantados con Recidiva de virus C</b>	<b>63</b>
<b>2.3.2 Biopsia Hepática de pacientes No- Trasplantados</b>	<b>63</b>
<b>2.3.3 Biopsia Hepática de pacientes controles</b>	<b>64</b>
<b>2.4 Métodos</b>	<b>64</b>
<b>2.4.1 Diseño del estudio</b>	<b>64</b>
<b>2.4.1 Criterios de Inclusión</b>	<b>64</b>
<b>2.4.4 Criterios de Exclusión</b>	<b>65</b>
<b>2.4.5 Criterios de Eliminación</b>	<b>65</b>
<b>2.4.6 Cálculo del Tamaño de la Muestra</b>	<b>65</b>
<b>2.5 Muestras</b>	<b>66</b>
<b>2.5.1 Extracción de RNA</b>	<b>67</b>
<b>2.5.2 Precipitación de RNA</b>	<b>68</b>
<b>2.5.3 RT-PCR</b>	<b>70</b> ®
<b>2.5.4 PCR</b>	<b>72</b>
<b>2.5.5 Documentación del Gel y Sistema de Imágenes</b>	<b>74</b>
<b>2.6 Tipos de Variables</b>	<b>75</b>
<b>2.7 Análisis Estadístico</b>	<b>77</b>
<b>2.8 Aspectos Éticos</b>	<b>78</b>
<b>2.9 Flujograma de Actividades</b>	<b>79</b>

<b>III.- RESULTADOS</b>	<b>80</b>
3.1 Constitución de los Grupos de estudio	80
3.2 Variables demográficas	80
3.3 Rechazo	81
3.4 Carga Viral	81
3.5 Genotipos virales	82
3.6 Exámenes de laboratorio	83
3.7 Características del RNA	85
3.8 Factor transformante de crecimiento $\beta$	87
3.9 Fibrosis	91
3.9.1 Velocidad de la progresión a fibrosis	99
3.9.2 Índice de progresión a fibrosis	101
3.10 Grado de inflamación	103
3.11 Tipo de inmunosupresor usado	105
3.12 Variables diversas	110
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>119</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>128</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS</b>	<b>130</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>131</b>

<b>APENDICES</b>	<b>150</b>
<b>APÉNDICE A.-DECLARACION DE HELSINKY</b>	<b>151</b>
<b>APÉNDICE B.-CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	<b>156</b>



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Páginas</b>
I.	Indicaciones de trasplante hepático	10
II.	Momento adecuado para el trasplante	12
III.	Contraindicaciones generales del trasplante hepático	21
IV.	Contraindicaciones específicas del trasplante hepático	22
V.	Ensayos moleculares más utilizados para la detección del RNA-VHC	48
VI.	Historia Natural de la Recidiva de hepatitis C postrasplante Hepático	50
VII.	Secuencia de parejas de oligonucleótidos y tamaño de los fragmentos amplificados por PCR	72
VIII.	Características de los diferentes grupos de pacientes	82
IX.	Genotipos virales	83
X.	Exámenes de laboratorio en los tres grupos de pacientes	84
XI.	Características del RNA obtenido en los diferentes grupos de pacientes	86
XII.	Resultados del RNAm TGF $\beta$ en los diferentes grupos de estudio pacientes trasplantados	87
XIII.	Resultados del RNAmTGF $\beta$ en los pacientes trasplantados de acuerdo al grado de fibrosis ( leve, moderada o severa ) en la biopsia hepática	92
XIV.	Resultados comparativos del RNAmTGF $\beta$ entre los grupos de pacientes en relación al grado de fibrosis (leve, moderada a severa)	95
XV.	Resultados comparativos del RNAmTGF $\beta$ entre los diferentes Grupos de pacientes de acuerdo al grado de fibrosis	96

XVI.	Resultados del RNAmTGF $\beta$ en relación a la rapidez de progresión de la fibrosis	99
XVII	Índice de progresión de fibrosis en los pacientes trasplantados con recidiva C	102
XVIII	Resultados comparativos del RNAmTGF $\beta$ entre los diferentes grupos de pacientes en relación al grado de Inflamación	104
XIX	Resultados comparativos del RNAmTGF $\beta$ en los pacientes trasplantados en relación al tipo de inmunosupresor usado	106
XX	Resultado de RNAmTGF $\beta$ en relación de la dosis acumulada el inmunosupresor usado, clasificado de acuerdo a los años de uso	108
XXI	Correlación entre el RNAmTGF $\beta$ y la dosis acumulada de corticoesteroides	110
XXII	Correlación del RNAmTGF $\beta$ con variables diversas	111
XXIII	Correlación entre el RNAmTGF $\beta$ y el sexo del receptor	112
XXIV	Comparación entre el RNAmTGF $\beta$ de acuerdo al sexo y al tiempo transcurrido desde el trasplante	114
XXV	Velocidad de progresión de la fibrosis en relación al sexo del receptor	115
XXVI.	Correlación entre la edad del donante categorizado por grupos De edad y la velocidad de progresión de la fibrosis en el receptor	116
XXVII.	Correlación entre la edad del donante y la velocidad de progresión de la fibrosis	118

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
1. Características fenotípicas de la activación de la célula estrellada durante una lesión hepática y su resolución	36
2. Prevalencia de Virus de Hepatitis C a nivel Mundial	42
3. Genoma del virus de la Hepatitis C	43
4. Péptidos usados para la detección serológica de la infección por VHC por el método de ELISA	45
5. Historia Natural de la recidiva de virus de hepatitis C postrasplante hepático	55
6. Fórmula para calcular el tamaño de la muestra	66
7. Diagrama de la estrategia para la Extracción del RNA total a partir de tejido hepático	68
8. Estrategia para la precipitación del RNA y medición de su concentración y pureza por espectrofotometría	69
9. Determinación de los niveles de RNAmTGF $\beta$ por medio de la Reacción de Transcriptasa Reversa (RT-PCR)	71
10. Diagrama de la estrategia para la obtención de DNA de doble cadena por PCR	73
11. Documentación del gel y sistema de imágenes	75
12. Tipos de variables (a)	76
13. Tipos de variables (b)	77
14. Flujograma de actividades realizadas	79
15. Fotografía de geles dónde se muestra la expresión del RNAmTGF $\beta$ en los diferentes grupos de pacientes, así como la determinación semicuantitativa del mismo	91

16. Relación entre el RNAmTGFβ y el grado de fibrosis en el grupo de pacientes trasplantados con recidiva del VHC	93
17. Correlación entre el RNAmTGFβ y el grado de fibrosis	94
18. Expresión de RNAm de TGFβ en función del grado de fibrosis en pacientes con trasplante hepático y recidiva de hepatitis C y pacientes no trasplantados con hepatitis C, clasificados según el grado de fibrosis histológica (0,1,2,3,4)	97
19. Expresión del RNAmTGFβ en función del grado de fibrosis en pacientes trasplantados y no trasplantados con hepatitis C según el grado de fibrosis histológica	98
20. Demostración de la mayor expresión del RNAmTGFβ en fotografía de gel de agarosa en los pacientes con progresión rápida de la fibrosis versus pacientes que tuvieron progresión lenta	100
21. Relación del grado de inflamación, el nivel del RNAmTGFβ y el tipo de inmunosupresor usado	105
22. Relación del RNAmTGFβ y el tipo de Inmunosupresor usado	106
23. Correlación entre el RNAmTGFβ y el tipo de Inmunosupresor usado	107
24. Relación del RNAmTGFβ de acuerdo al grado de fibrosis y al tipo de inmunosupresor usado	109
25. Relación entre el RNAmTGFβ y el sexo del receptor	113
26. Correlación entre la edad del donante categorizado por grupos de edad y la velocidad de progresión de la fibrosis en el receptor	117
27. Correlación entre la edad del donante y la velocidad de progresión de la fibrosis en el receptor	118

## **ABREVIATURAS**

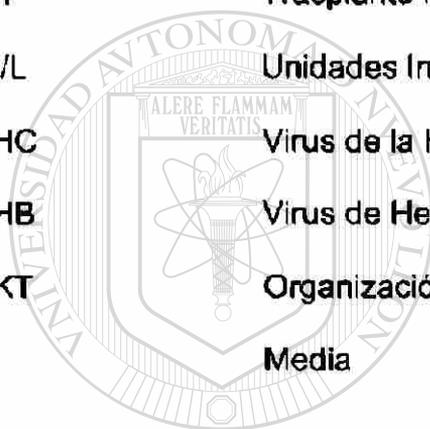
<b>ABO</b>	<b>Correspondencia del grupo sanguíneo</b>
<b>AcNa</b>	<b>Acetato Sódico</b>
<b>AceHB</b>	<b>Anticuerpo contra el antígeno e de la hepatitis B</b>
<b>AgeHB</b>	<b>Antígeno e de la hepatitis B</b>
<b>Anti-CMV</b>	<b>Anticuerpo contra el Citomegalovirus</b>
<b>Anti-EBV</b>	<b>Anticuerpo contra el virus del epstein-barr</b>
<b>Anti-HIV</b>	<b>Anticuerpo contra el virus de la inmunodeficiencia humana</b>
<b>AgsVHB</b>	<b>Antígeno de superficie del virus de hepatitis B</b>
<b>AcsHB</b>	<b>Anticuerpo contra el antígeno de superficie de la hepatitis B</b>
<b>Anti-VHC</b>	<b>Anticuerpo contra el virus de Hepatitis C</b>
<b>Anti-VHD</b>	<b>Anticuerpo contra el virus de Hepatitis D</b>
<b>Alb</b>	<b>Albúmina</b>
<b>ALT</b>	<b>Alanin Aminotrasferasa</b>
<b>AML</b>	<b>Anticuerpos antimúsculo liso</b>
<b>AMA</b>	<b>Anticuerpos antimitocondriales</b>
<b>ANOVA</b>	<b>Análisis de variancia (prueba estadística)</b>
<b>AST</b>	<b>Aspartatoaminotrasferasa</b>
<b>AZA</b>	<b>Azatioprina</b>
<b>BH</b>	<b>Biometría Hemática</b>
<b>BD</b>	<b>Bilirubina directa</b>
<b>BI</b>	<b>Bilirubina indirecta</b>
<b>BT</b>	<b>Bilirubina total</b>

<b>CBP</b>	<b>Cirrosis Biliar Primaria</b>
<b>CEP</b>	<b>Colangitis Esclerosante Primaria</b>
<b>Creat</b>	<b>Creatinina</b>
<b>CsA</b>	<b>Ciclosporina</b>
<b>CsCl</b>	<b>Cloruro de Cesio</b>
<b>COETRA</b>	<b>Consejo estatal de trasplantes</b>
<b>CONATRA</b>	<b>Consejo nacional de trasplantes</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido Desoxiribonucleico</b>
<b>DNA-VHB</b>	<b>DNA del virus de hepatitis B</b>
<b>cDNA</b>	<b>DNA complementario</b>
<b>DE</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>DEPC</b>	<b>Dietilpirocarbonato</b>
<b>ECO</b>	<b>Ecografía</b>
<b>ECG</b>	<b>Electrocardiograma</b>
<b>EEUU</b>	<b>Estados Unidos de Norteamérica</b>
<b>ELISA</b>	<b>Ensayo inmunoabsorbente vinculado con enzimas</b>
<b>ET-1</b>	<b>Endotelina 1</b>
<b>EW</b>	<b>Enfermedad de Wilson</b>
<b>F</b>	<b>Femenino</b>
<b>FA</b>	<b>Fosfatasa Alcalina</b>
<b>FK</b>	<b>Tacrolimus</b>
<b>g/L</b>	<b>Gramos por Litro</b>
<b>GADPH</b>	<b>Gliceraldehid fosfato deshidrogenasa</b>

<b>GC</b>	<b>Grupo control</b>
<b>Glob</b>	<b>Globulinas</b>
<b>GGT</b>	<b>Gamaglutamintraspeptidasa</b>
<b>GTC</b>	<b>Guanidin tiocianato</b>
<b>Hb</b>	<b>Hemoglobina</b>
<b>HH</b>	<b>Hemocromatosis Hereditaria</b>
<b>Hto</b>	<b>Hematocrito</b>
<b>HLA</b>	<b>Complejo mayor de histocompatibilidad</b>
<b>IgG anti-HBc</b>	<b>Anticuerpo contra el core, IgG del virus de hepatitis B</b>
<b>IgM anti-HBc</b>	<b>Anticuerpo contra el core, IgM de virus de hepatitis B</b>
<b>IL-1</b>	<b>Interleucina 1</b>
<b>IL-2</b>	<b>Interleucina 2</b>
<b>IL-4</b>	<b>Interleucina 4</b>
<b>IMP</b>	<b>Inosinmonofosfatodeshidrogenasa</b>
<b>K/μL</b>	<b>Por microlitro</b>
<b>Leu</b>	<b>Leucocitos</b>
<b>M</b>	<b>Masculino</b>
<b>min</b>	<b>Minuto</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>MMP-2</b>	<b>Metaloproteinasa ( gelatinasa)</b>
<b>μL</b>	<b>Microlitro</b>
<b>ME</b>	<b>Mercaptoetanol</b>

mg	Miligramos
MPD	Metilprednisolona
mm	Milímetro
n	Número de pacientes
ng/μL	Nanogramos por microlitro
NA	No aplica
NF-AT	Factor nuclear de las células T activadas
N <sub>2</sub>	Nitrógeno líquido
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
p	Significancia estadística
PBH	Punción biopsia hepática
PFH	Pruebas de Función Hepática
Plaq	Plaquetas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
RIBA	Ensayo de inmunoblot recombinante
ROS	Radicales superóxido
Rh	Antígeno Rhesus
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Acido ribonucleico
RNAasa	Enzima RNAasa
RNAm	RNA mensajero

rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de Transcriptasa Reversa
t	Comparación de dos medias (prueba estadística)
TAC	Tomografía axial computarizada
TGF $\beta$	Factor Trasformante de Crecimiento $\beta$
TIPS	Comunicación intrahepática portosistémica
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis tumoral alfa
TH	Trasplante Hepático
UI/L	Unidades Internacionales por litro
VHC	Virus de la Hepatitis C
VHB	Virus de Hepatitis B
SKT	Organización de trasplantes de países escandinavos
X	Media



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

Laura Esthela Cisneros Garza      Fecha de Graduación: Octubre, 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio: FIBROGENESIS HEPATICA EN LA RECIDIVA C**

**POSTRASPLANTE: PAPEL PATOGENICO DEL TGF $\beta$**

**Número de páginas:**

**Candidato para el grado de Doctor en**

**Medicina con especialidad en**

**Hepatología**

**Área de Estudio: Ciencias de la Salud**

**Propósito y Método de Estudio:** Los pacientes que son sometidos a trasplante

Hepático por cirrosis por virus de Hepatitis C, presentan de manera universal

recidiva de la infección por el VHC, con una característica fundamental, fibrosis

acelerada con rápida progresión a hepatopatía grave e irreversible. Sin embargo

los factores involucrados en la fibrosis acelerada del injerto en éstos pacientes

nunca habían sido investigados. El TGF $\beta$  es la citoquina más importante en el

desarrollo del proceso fibrogénico, al favorecer la fibrogénesis a través de su

efecto estimulador sobre las células estrelladas, aumentando los niveles del

RNAm del procolágeno tipo 1, además de inhibir los procesos colagenolíticos.

Distintos estudios *in vitro* han sugerido que los dos inmunosupresores fundamentales en el trasplante hepático. La Ciclosporina y el Tacrolimus , tienen efectos contrapuestos, Ciclosporina estimulando la producción de TGF $\beta$  y Tacrolimus inhibiéndolo. Este posible efecto regulador de los inmunosupresores sobre el TGF $\beta$  no había sido investigado en el trasplante hepático. Por lo que el objetivo general del presente estudio fue: Investigar la correlación de los niveles del RNAmTGF $\beta$  y el grado de fibrosis en la recidiva del VHC postrasplante, y como objetivos específicos fueron. Determinar los niveles del RNAmTGF $\beta$  en tejido hepático en pacientes con trasplante hepático con recidiva de la hepatitis C y determinar el grado de fibrosis en los mismos pacientes estableciendo su correlación, así como investigar si el tipo de fármaco inmunosupresor fundamental: Ciclosporina o Tacrolimus, y sus dosis acumulativas determinan los niveles del RNAmTGF $\beta$  en éstos pacientes, por lo que se realizó un estudio observacional analítico, transversal comparativo incluyéndose tres poblaciones de pacientes, pacientes trasplantados y con recidiva de la hepatitis C, pacientes no trasplantados tanto portadores de cirrosis hepática por virus C, como de hepatitis crónica secundaria a virus C y pacientes controles determinándoseles en muestras de tejido el RNAmTGF $\beta$  ,por RT-PCR y realizando una PCR semicuantitativa para la obtención de los resultados.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se encontró relación estadísticamente significativa entre el nivel del RNAmTGF $\beta$  y el grado de fibrosis en la biopsia

hepática. El RNAmTGF $\beta$  se expresa más a mayor grado de fibrosis. El grado de expresión no depende del tipo de inmunosupresor empleado, ya que no existió diferencia significativa en la expresión del RNAmTGF $\beta$  en relación al tipo de inmunosupresor usado. Así mismo se encontró mayor intensidad de expresión del RNAmTGF $\beta$  en pacientes trasplantados con recidiva C y fibrosis rápida que en los que tenían fibrosis lenta, lo cual nos dice que la expresión del RNAmTGF $\beta$  es más intensa a mayor rapidez de progresión de la fibrosis. El índice de progresión de la fibrosis en los pacientes trasplantados con recidiva de hepatitis C fue de 12 años en comparación de los 30 años que se han reportado en la literatura por Poynard el cual se encuentra en pacientes con hepatitis crónica C no inmunosuprimidos. EL TGF $\beta$  juega un papel en la fibrosis del injerto en pacientes con trasplante hepático y recidiva C, no obstante ya que la intensidad de la expresión del TGF $\beta$  en los pacientes trasplantados no difiere significativamente de la observada en los pacientes no trasplantados con hepatitis C, por lo que la gran rapidez de progresión de la fibrosis en los pacientes trasplantados con recidiva C, ha de ser debida a mecanismos no reflejados por el grado de expresión del TGF $\beta$ , cabe sugerir que otros mecanismos profibrogénicos están también activados y/o que los mecanismos colagenolíticos están disminuidos para poder justificar la progresión acelerada del depósito de colágena en el injerto hepático en los pacientes con recidiva C postrasplante.

---

Firma del Asesor

# CAPITULO I

## INTRODUCCION

### 1.1 EVOLUCION DEL TRASPLANTE HEPATICO:

#### **Pasado, Presente y Futuro**

La historia de los trasplantes es un ejemplo de como la medicina moderna ha progresado extraordinariamente gracias a su trabajo en equipo, a su superespecialización y a su carácter multi e interdisciplinario. La conjunción de numerosos factores, el desarrollo de las diversas ramas de las ciencias médicas y básicas, así como la tecnología moderna, han hecho que los trasplantes de órganos, que se consideraban un reto lejano en la década de los sesenta, constituyan en la actualidad un procedimiento rutinario de la práctica médica, lo cual ha contribuido a prolongar la supervivencia global de la población.

Los trabajos experimentales de la primera década del siglo XX, encabezados por Alexis Carrel (1902), hicieron de los trasplantes de órganos vascularizados una realidad técnica. (1)

Posteriormente aparece la importancia del aspecto inmunológico en el trasplante, ya que la inmunología del trasplante nació con una serie de trabajos que demostraron que el rechazo de los órganos, se debe a un mecanismo inmunológico (fenómeno de segundo injerto y de la transferencia de la inmunidad) y que le valieron a Medawar (1944) el premio Nobel (1).

El primer trasplante hepático experimental usando una técnica auxiliar en perros, fue llevado a cabo hace 45 años, en 1955 por Welch de Albany, Nueva

York, que describió la inserción de un hígado auxiliar colocado heterotópicamente en la pelvis o en la región paravertebral. La vena porta fue anastomosada a la vena cava inferior y la arteria hepática a la aorta o a la arteria iliaca, no se usó inmunosupresión. El primer trasplante hepático experimental que fue ortotópico fue llevado a cabo por Cannon en la Universidad de California en los Angeles en 1956, sin embargo ninguno de los perros sobrevivió.

En 1958, Se establecieron dos sitios de investigación en Trasplante Hepático, el Hospital Peter Bent Brigham en Boston, Massachussets, bajo la dirección de Moore cuyo foco de investigación fue la Inmunología del trasplante Hepático (3) y la Universidad del Noreste de Chicago, bajo la dirección de Starzl, centrándose en la regeneración hepática y los factores de crecimiento hepatotróficos(4).

Las soluciones de preservación usadas que correspondían a solución salina fueron remplazadas por la solución de Collins, que permitía un tiempo de preservación de 5 a 6 horas ; más tarde la Universidad de Wisconsin logra un tiempo de preservación de 18 a 24 horas.(5)

En la década de los años cincuenta y sesenta, aparece la inmunosupresión, la cual inicia primero con la irradiación corporal total y posteriormente la aparición de la inmunosupresión química con el uso de la azatioprina en 1963, cuando se comienza a pensar en los trasplantes de órganos como una realidad clínica, realizándose los primeros trasplantes clínicos con éxito (de riñón en París y Boston, de hígado en Denver, de páncreas en Minnessotta y de corazón en Ciudad del Cabo y en Stanford). Así mismo otros factores importantes que durante éste período influyeron en el desarrollo de los trasplantes clínicos fueron los trabajos sobre HLA y tipificación tisular de Dausset y Terasaki, los avances sobre

preservación de órganos mediante técnicas de perfusión ex situ, y el reconocimiento en 1968 de la muerte cerebral.

De primer intento de trasplante hepático en humanos fue realizado por Starzl en 1963, el receptor fue un niño de tres años de edad con atresia de vías biliares, que había tenido múltiples operaciones previamente y que murió por coagulopatía incontrolable (4,6). El primer trasplante humano exitoso fue llevado a cabo por Starzl en 1967 en la Universidad de Colorado, siendo el receptor un niño de 18 meses de edad con carcinoma hepatocelular con sobrevida de más de un año, falleciendo por recurrencia tumoral(4 ).

Posteriormente se establecieron grupos de estudio en trasplante hepático a nivel mundial Calne de la Universidad de Cambridge y el hepatólogo Williams de el hospital King's College en Londres (7), en 1972 en Hanover, Alemania bajo la dirección de Pichlmayr y en París en 1974 un grupo dirigido por Bismuth.

Se demostró que el trasplante hepático era una realidad sin embargo iba acompañado de una gran mortalidad por lo que no era una solución práctica.

En la década de los 70 los centros pioneros realizaron experiencias en trasplantes, de riñón, hígado y corazón, desarrollándose las técnicas quirúrgicas y anestésicas, el control postoperatorio, un mejor conocimiento de los mecanismos inmunológicos del rechazo , y la detección oportuna y manejo de las infecciones, y lo que hizo una realidad y consolidó todos los programas de trasplante fue la aparición en 1972 de la Ciclosporina A por Borel y sus primeras aplicaciones clínicas por R Clane en 1978 revolucionaron la Inmunosupresión y el trasplante de órganos; La CsA es un potente inmunosupresor que permitió romper la barrera

Inmunológica que es la colocación de un órgano extraño a un organismo vivo, sin ser rechazado(8,9).

En 1984 se descubrió el tacrolimus conocido como FK-506 a partir de 1989 fue introducido por el Dr Starz en Pittsburg, primero como alternativa a la ciclosporina en los rechazos refractarios y crónicos y después en la inmunosupresión primarias. El FK es un potente inhibidor de la calcineurina (10) y posteriormente el desarrollo de anticuerpos monoclonales.

Posteriormente en los 90's nuevos agentes inunosupresores como: el Micofenolato Mofetil y la Rapamicina (11)

Y a finales del siglo XX: el problema principal radica en la búsqueda de nuevas fuentes de órganos, ya que al considerarse el trasplante como la terapéutica de elección en las enfermedades terminales del hígado, el número de los pacientes en lista de espera rebasa a los pacientes, a quienes se les puede realizar el trasplante ya que la donación de órganos de donante cadavérico varía de país a

país, teniendo como el mejor ejemplo en donación de órganos a España con un número de donaciones por año de 33.9 por millón de habitantes, seguido por Bélgica con una donación de 25.6 por millón de habitantes, Austria con 24 donaciones por millón de habitantes, Estados Unidos 22.3 y México alrededor de .7 donaciones por millón de habitantes, y aún países como España quien tiene tanta donación cadavérica aún así existe una mortalidad en lista de espera de 15-25% al año por lo que se han ideado nuevas estrategias para obtención de mayor cantidad de órganos : entre ellas tenemos el Donante Vivo (12), éste tipo de trasplante se inició para dar respuesta a la falta de órganos del tamaño adecuado para la edad infantil. La ausencia de injertos daba lugar a una mortalidad en la lista

de espera que ascendía hasta un 30% en la población infantil. La obtención de un segmento hepático a partir de un familiar del niño, generalmente de la madre, o el padre, permitió dar la oportunidad del trasplante hepático a éstos niños. Primero inicio en Estados Unidos y después en países asiáticos, donde desde el punto de vista legal, la donación cadavérica estaba muy limitada, y la donación de donante vivo relacionado fue aceptada, permitieron confirmar las expectativas de éste trasplante, reduciendo en forma drástica la mortalidad en listas de espera, y consiguiendo una supervivencia a largo plazo cercana al 85%(14). Poco a poco, la experiencia que se iba adquiriendo en el donante vivo(12,13,14), ha permitido la división del hígado a partir del donante cadáver, con la misma seguridad para los dos segmentos creados, dando lugar al Donante Dividido (Donante Split) (15), éste procedimiento permite dos trasplantes hepáticos de un mismo donante cadavérico, implantando el lóbulo derecho a un receptor adulto el lóbulo izquierdo o el segmento lateral izquierdo trasplantado a un niño. Los órganos usados en el trasplante dividido pueden ser compartidos entre dos instituciones o usarse en un mismo centro de trasplantes todo esto ha hecho que la lista de trasplante hepático infantil, sea una realidad y la lista de espera en Europa sea prácticamente nula. Se han ideado técnicas para la obtención de órganos de donantes en asistolia, se han tratado de usar hígados de donantes subóptimos, por ejemplo con esteatosis hepática, o trasplantar órganos de pacientes con virus C a un receptor de portador de cirrosis hepática secundaria a virus C.

El Xenotrasplante es el uso de otras especies animales como fuente de órganos para los humanos, usando al cerdo, como un donador potencial de hígado, esto se basa e que el tamaño hepático es apropiado, en que existen recursos

ilimitados, en la capacidad de tratarlos con ingeniería genética, y el control más fácil del riesgo de infecciones zoonóticas.(16,17) El problema principal del xenotrasplante reside en la posibilidad de rechazo hiperagudo, agudo y rechazo celular, así como el riesgo potencial de transmisión de agentes infecciosos de el cerdo al receptor.

El futuro del trasplante hepático se centra en la aplicación de nuevas técnicas, como son: El trasplante de hepatocitos, en el que las células hepáticas pueden ser aisladas de un número de especies incluyendo los humanos, cultivadas y criopreservadas para su uso futuro. Las células cultivadas pueden ser directamente trasplantadas de donadores alogénicos (un proceso que requiere inmunosupresión) o trasplantadas hacia un individuo después de ser obtenidas quirúrgicamente realizándosele en cultivo transducción con un gen terapéutico para una proteína defectuosa o ausente; no requiriendo por ende de inmunosupresión.(18,19)

Y por último tenemos a la terapia génica que puede ser usada para remplazar un gen perdido, expresar un gen que no es normalmente expresado en el hígado, interferir con una expresión génica o reparar un gen mutado. Se han desarrollado vectores virales y no virales dirigidos al hígado (20).

Se espera que en el futuro, la necesidad de trasplante hepático disminuya, de lograrse el desarrollo de tratamientos médicos efectivos, usando terapia génica, lo que lograría resolver problemas metabólicos virales e inmunológicos

## 1.2 OBTENCION DE ORGANOS PARA TRASPLANTE

Existen además otros factores que han sido imprescindibles para lograr el éxito en tales programas como son: la disposición de órganos en óptimas condiciones para trasplantar y la aparición de organismos que se encargan de la coordinación de la donación de órganos.

Al inicio en la década de los ochenta, los equipos de trasplante renal eran en la práctica autónomos, trasplantando los riñones obtenidos en sus propios hospitales o en centros próximos cuyos pacientes se encontraban en lista de espera en el centro de trasplantes, siendo los propios hospitales los que crearon su propio sistema de coordinación.

Hasta que se estableció el Modelo Organizativo Español (21), en el que la Organización Nacional de Trasplantes creada sobre papel en una resolución del 27 de Junio de 1980 y siendo dotada de estructura física en 1989, basó su estrategia en un objetivo principal, la obtención de órganos para trasplantes, creando para ello una red de coordinación a tres niveles: Nacional, Regional y Local consiguiéndose descentralizar el sistema de coordinación y conseguir el máximo nivel de cooperación en objetivos comunes, éste modelo de obtención de órganos ha sido un modelo prototipo que se ha tratado de instaurar en otros países para incrementar la donación de órganos para trasplante(22). Al mismo tiempo se ha tratado de concientizar a la población, con programas continuos de información a través de los medios de comunicación, y capacitación de la población desde la educación primaria sobre la cultura de donación de órganos (23,24).

### 1.3 INFRAESTRUCTURA DE UNA UNIDAD DE TRASPLANTE HEPATICO:

Para la realización del Trasplante Hepático se requiere una infraestructura importante, pudiéndose realizar solamente en hospitales de tercer nivel, en el que se estén realizando ya de antemano un programa trasplantes, pudiendo ser éste de niño. Requiriendo un equipo de expertos en diferentes áreas:

- a) *Quirúrgica: el trasplante hepático requiere un equipo quirúrgico experto en cirugía hepática, además de contar con el personal necesario tanto para la extracción del hígado del donante y el equipo encargado de la implantación del hígado en el receptor.*
- b) *Donación: A cargo del Coordinador de Trasplantes: TPM (Trasplant Procurement Management) es el profesional que obtiene y distribuye los órganos y tejidos para el trasplante (25).*
- c) *Intensivistas: que llevarán a cabo el manejo postoperatorio inmediato, con la detección temprana de complicaciones.*
- d) *Hepatología: Se requiere personal experto en la evaluación y el manejo de las enfermedades hepáticas, la evaluación pretrasplante, la evaluación preoperatoria y el seguimiento postoperatorio, la instauración y el control y seguimiento del tratamiento inmunosupresor. Así como la detección de complicaciones tempranas y tardías y su tratamiento.*
- e) *Pediatría: quien correspondería a un gastroenterólogo pediatra quien tendría las mismas funciones del hepatólogo en los pacientes pediátricos.*

f) **Infectología:** ya que los pacientes trasplantados cursan con infecciones oportunistas favorecidas por el uso de inmunosupresión, se requiere la participación activa del servicio de infectología.

Se requiere integrar un Comité de selección para evaluar a los individuos candidatos a Trasplante Hepático, que serán inscritos en la lista de espera, deberá de constar de personal médico: Hepatólogos y de personal quirúrgico: Cirujanos asplantólogos, así mismo de anestesiistas, junto con uno o varios miembros del comité de ética.

#### **1.4 INDICACIONES DE TRASPLANTE HEPATICO:**

Cualquier enfermedad hepática grave, mortal y sin tratamiento alternativo eficaz es tributaria a trasplante hepático, cuando sabemos que las posibilidades de supervivencia al año son menores que con el trasplante. Se debe recomendar el trasplante cuando se estime que el (la) paciente tiene un 90% de posibilidades de

fallecer al año sin trasplante (26,27). Las categorías que actualmente constituyen indicación de trasplante hepático en pacientes adultos se describen en la tabla I.

Las indicaciones del trasplante hepático quedan divididas, en 1) colestasis crónica

2) Cirrosis de origen no biliar (o de origen hepatocelular) 3) tumores hepáticos

4) insuficiencia hepática aguda 5) otras enfermedades congénitas y metabólicas.

**COLESTASIS CRONICAS:**

- Cirrosis Biliar Primaria
- Colangitis Esclerosante Primaria

**CIRROSIS DE ORIGEN NO BILIAR O DE ORIGEN HEPATOCELULAR:**

- Posthepatítica C
- Posthepatítica B
- Alcohólica
- Autoinmune
- Criptogénica

**TUMORES HEPATICOS:**

- Hepatocarcinoma

**INSUFICIENCIA HEPATICA AGUDA:**

- Hepatitis Virica
- Hepatitis Tóxico- Medicamentosa
- Causa Indeterminada

**OTRAS ENFERMEDADES:**

Trastornos Metabólicos hepáticos con o sin afectación estructural del hígado:

- Hemocromatosis
- Enfermedad de Wilson
- Polineuropatía Amiloidótica Familiar
- Hiperoxaluria Primaria Tipo 1

. Síndrome de Budd Chiari

### 1.4.1 COLESTASIS CRÓNICAS

Dentro de las colestasis crónicas tenemos a la cirrosis biliar primaria (CBP) y a la colangitis esclerosante primaria (CEP) Tabla I.

La CBP, es una inflamación y destrucción crónica de los conductos biliares intrahepáticos, que conduce al desarrollo de colestasis crónica, es un problema que se presenta en mujeres de edad media, de la 4ta a 6ta década de la vida, con elevación de IgM y anticuerpos antimitocondriales positivos, específicamente los M2. El ácido ursodesoxicólico puede mejorar la sobrevida y retasar la necesidad de trasplante (28). La mayor parte de los centros de trasplantes reportan sobrevida a un año de 85-90% y a 5 años de 70 a 80%(29). El momento adecuado para la realización del trasplante está mostrado en la tabla II., en el apartado de colestasis crónicas. El riesgo de recurrencia postrasplante, se reporta en 8.7%(30). La presencia de células plasmáticas en el infiltrado portal parece ser un marcador temprano de recurrencia (31,44)

La colangitis esclerosante primaria (CEP), colestasis crónica secundaria a lesiones de inflamación, estenosis y dilatación de la vía biliar intra y extrahepática y conduce a una cirrosis de tipo biliar (32). Son frecuentes los episodios de colangitis presentándose además complicaciones de hipertensión portal. Se asocia a enfermedad intestinal inflamatoria, sobretodo a colitis ulcerosa crónica inespecífica. En el 5-25% de los casos puede desarrollarse un colangiocarcinoma que es una contraindicación de trasplante por el riesgo elevado de recidiva postrasplante, por lo que debe descartarse su presencia en el estudio pretrasplante. La indicación más importante de trasplante en ésta enfermedad son los cuadros de colangitis de repetición, otras serían, insuficiencia hepática grado

**. COLESTASIS CRONICAS:** Cuando presenten uno o más factores

- Bilirrubina sérica > 10 mg/dl
- Albúmina sérica < 2.8 g/L
- Ascitis
- Encefalopatía hepática
- En Colangitis esclerosante primaria: infección biliar recidivante

**. CIRROSIS NO BILIAR:**

- Desnutrición
- Albúmina sérica < a 2.8 g/L
- Ausencia de Hepatomegalia
- Antecedente de peritonitis bacteriana espontánea
  - Síndrome hepatorenal
  - Excreción urinaria de sodio < 2 mEq/24 horas
  - Sodio plasmático < 133 mEq/L

- Máximo volumen urinario tras sobrecarga acuosa < 6 ml/min

- Presión arterial media < 85 mmHg

- Pacientes con encefalopatía hepática crónica
- Pacientes con hemorragia variceal y función hepática grado C de Child-Pugh

**. HEPATOCARCINOMA.**

- Diámetro:nódulo único: < 5 cm.
- .multinodular: 2 ó 3 nódulos, diámetro del nódulo mayor < 3 cm.
- Ausencia de invasión tumoral de grandes vasos hepáticos
- Ausencia de metástasis extrahepáticas
- Tumor no tributario de resección quirúrgica

B/C Child, bilirrubina sérica superior a 6mg/dl, el prurito intratable, y la osteopatía grave. Presenta recidiva postrasplante en un 9% de los casos (34,44)

#### **1.4.2. CIRROSIS DE NO BILIAR O DE ORIGEN HEPATOCELULAR**

Dentro de éste grupo se encuentran las cirrosis secundarias a Hepatitis B, la secundaria a Hepatitis C, la cirrosis de origen alcohólico, la de origen auto inmune y la criptogénica en la que desconocemos la etiología. estableciéndose como momento adecuado de trasplante las características mostradas en la tabla II, pacientes con estado funcional B o C de Child, que presenten descompensación de su hepatopatía crónica, ya sea con ascitis intratable, con antecedentes de peritonitis bacteriana espontánea o la presencia de síndrome hepatorenal, pacientes con encefalopatía hepática crónica, o aguda secundaria a una insuficiencia hepática aguda o con hemorragia variceal que no cede a manejo establecido, ya se con escleroterapia, ligadura de várices, o con la colocación de

TIPS(35). Existen características específicas en cada patología:

La cirrosis secundaria a virus B, la cual se consideraba contraindicación de trasplante, hasta el advenimiento de la lamivudina , actualmente está aceptada como indicación de trasplante una vez se ha negativizado el DNA del virus por medio de terapéutica con lamivudina que se usa como tratamiento pretrasplante(36), podrá realizarse el trasplante, bajo una estrecha vigilancia para evitar la recidiva del virus usando gammaglobulina hiperinmune postrasplante inmediato a razón de 10,000UI intravenosa, en fase anhepática y a las 24 hrs. del trasplante, y continuar con 4,000 Ui diarias la primer semana, 4,000 UI semanales por 1 mes y luego 4,000 UI mensuales, hasta lograr tener un nivel de anticuerpos

por arriba de de 100 UI/ml si el paciente entró al trasplante con AgeVHB (-) y DNA VHB (-), pero si ambos fueran positivos requeriría mantener un nivel de anticuerpos por arriba de 500 UI (37), junto con lamivudina a dosis de 100 mg diarios (38) Recientemente se ha publicado el uso de inmunidad activa al año del trasplante, cuando la inmunosupresión se ha disminuido, para lograr la aparición de inmunidad activa, evitando la necesidad de inmunoprofilaxis a largo plazo(39). (Tabla IV).

La cirrosis secundaria a virus C se trata con mayor amplitud en la sección 1.11.

La cirrosis postalcohólica, es la indicación más frecuente de trasplante en Estados Unidos de Norteamérica (40), se reportan alrededor de 12,000 muertes anuales de enfermedad hepática alcohólica, es una excelente indicación de trasplante logrando una sobrevida mayor de un 70% a 5 años. Era contraindicación de trasplante por el riesgo de reincidencia alcohólica, pero actualmente es indicación si reúne ciertos requisitos : es indispensable una evaluación psiquiátrica antes de ser aceptados como candidatos a trasplante hepático; requiere de un período de abstinencia de 6 meses como mínimo, para evaluar la capacidad del paciente para mantener la abstinencia alcohólica y para evaluar la mejoría de la función hepática, retrasando incluso la inclusión en lista de espera , de existir mejoría en la misma. Deberá realizarse valoración de enfermedades extrahepáticas, descartar afección neurológica y cardiología neurológica. Requieren un apoyo familiar y social estable y fuerte, para seguir indicaciones postrasplante (41). (Tabla IV)

La cirrosis secundaria a hepatitis autoinmune, se presenta principalmente en mujeres, con inflamación progresiva y fibrosis del hígado con subsecuente cirrosis

y falla hepática. La terapéutica con corticosteroides provoca remisión de la enfermedad clínica en 80% de los pacientes, prolonga la sobrevida media y logra sobrevida a 10 años del 90%.(42) comparte las indicaciones generales del trasplante hepático, se deberá proponer el trasplante en pacientes con pobre respuesta a manejo médico, ausencia de remisión bioquímica y datos de insuficiencia hepatocelular grave(43).La sobrevida postrasplante es alrededor de 90% a 5 años, existe un 30-40% de recurrencia después del trasplante hepático, por lo que una condición importante es no retirar esteroides; deberá mantenerse por largos períodos de tiempo, el riesgo de recurrencia parece estar relacionado a incompatibilidad HLA DR3(44).

#### 1.4.3 TUMORES HEPÁTICOS

El Hepatocarcinoma (HCC) es otra indicación de trasplante que ha evolucionado con los años, ya que se consideraba una contraindicación (45). Aunque la resección quirúrgica se considera el tratamiento de elección, con sobrevida a 5 años 25-60%(46) con riesgo de recidiva del 50 al 86% y con trasplante hepático el riesgo disminuye al 10%(47) existen otras modalidades terapéuticas como la inyección de etanol absoluto, en lesiones pequeñas de menos de 3 cms ( 48 ) o la quimioembolización (49). Los resultados muestran que es una indicación de trasplante si cumple requisitos específicos mostrados en tabla III (50,51) el problema radica en que el tiempo que éstos pacientes permanecen en lista de espera, puede hacer que hepatocarcinomas pequeños que eran candidatos óptimos a trasplante, desarrollen enfermedad progresiva antes de ser

trasplantados, por lo que deberá instaurarse tratamiento en lista de espera, con quimioterapia, embolización tumoral, o la inyección de alcohol absoluto.

#### **1.4.4 INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA**

La Insuficiencia hepática Aguda que se define como el desarrollo de encefalopatía hepática y coagulopatía severa dentro de las 8 semanas del inicio de los síntomas, en un paciente que se encontraba previamente sano, sin enfermedad hepática preexistente. Puede ser secundaria a sobredosis de acetaminofén, ingestión de hepatotóxicos, ingestión de hongos como es: amanita phalloides, lesión hepática secundaria a drogas, Hepatitis A, y B, enfermedad de Wilson y de etiología desconocida, en ocasiones. Debe darse tratamiento de soporte en una unidad de cuidados intensivos, con recuperación espontánea y completa en algunos pacientes, sin evidencia de lesión residual. Sin embargo en otros puede sobrevenir la muerte por edema cerebral y falla multiorgánica, debe de trasplantarse lo más rápido posible, en ocasiones una solución temporal es poner al paciente en un hígado bioartificial mientras se consigue un donante (53). El trasplante hepático está indicado cuando presenten encefalopatía III-IV sin respuesta a manejo o cuando tengan factor  $V < 12\%$ .

#### **1.4.5. OTRAS ENFERMEDADES**

Dentro del grupo de otras enfermedades, que requieren trasplante hepático tenemos: Enfermedades congénitas o metabólicas como serían: La Hemocromatosis hereditaria (HH), es una enfermedad de transmisión autosómica recesiva, con una prevalencia estimada entre 1:200 o 1:300 entre la población

blanca, (54) caracterizada por acumulación excesiva de hierro en diferentes órganos como hígado, corazón, páncreas, gónadas, éste es responsable del desarrollo de cirrosis y de carcinoma hepatocelular. Los resultados del trasplante parecen ser inferiores a los obtenidos por otras indicaciones deben descartarse complicaciones cardiológicas pretrasplante (54)

La enfermedad de Wilson (EW) es un trastorno de la eliminación hepatobiliar de cobre, que determina el desarrollo de hepatitis severa aguda o cirrosis hepática y lesiones graves del sistema nervioso central. Se trata de aumentar su eliminación por medio de tratamientos farmacológicos como son la D-Penicilamina y trientina.

El trasplante hepático revierte las anomalías metabólicas asociadas a enfermedad de Wilson, sin embargo sin mejoría en las alteraciones neurológicas

Sobrevivida postrasplante entre 70-90%(55)

Otras indicaciones de trasplante menos comunes son por ejemplo:

a) la polineuropatía amiloidótica familiar. Es una enfermedad autosómica

---

dominante, (56) causada por la mutación en un gen que codifica a transterritina. La variante más frecuente es la portuguesa o tipo 1, con mutación del gen Met 30, en la que se sustituye una valina en la posición

30 de la cadena de aminoácidos de la transterritina por metionina. La transterritina anómala se deposita en forma de amiloide, causando una polineuropatía periférica, neuropatía autonómica y desnutrición, miocardiopatía, opacidades vítreas y síndrome nefrótico con insuficiencia renal. El trasplante hepático logra descenso en la concentración de la transterritina anómala, detiene la progresión de la enfermedad y mejora tanto la neuropatía periférica como el estado nutricional(57,58)

Por la falta de órganos para trasplante se ha propuesto el uso de el hígado de éstos pacientes a donantes mayores de 60 años de edad, ya que el desarrollo de la enfermedad toma de 25 a 30 años, que sería la sobrevida esperada en éstos pacientes con o sin la enfermedad, es lo que se conoce como trasplante dominó .(59)

b) La hiperoxaluria primaria: es una rara enfermedad autosómica recesiva con deficiencia de una enzima: la alanina.glioxilato aminotrasferasa, producido por mutaciones en el cromosoma 2. Acumulándose glioxilato que se oxida a oxalato, la eliminación urinaria de éste oxalato produce nefrolitiasis de repetición, nefrocalcinosis, e insuficiencia renal crónica; el trasplante renal único limita la sobrevida a los tres años a 26%. El doble trasplante hepático –renal aumenta la sobrevida importantemente 80 y 70% a los 5 y 10 años respectivamente (60).

c) Síndrome de Budd-Chiari: es la consecuencia de la interrupción del retorno venoso hepático (56). Se asocia a fenómenos de hipercoagulabilidad (síndromes mieloproliferativos, tumores, uso de hormonales, déficit de antitrombina III, proteína C o proteína S). También se presenta como consecuencia de trasplante de médula ósea secundario a esclerosis subendotelial y trombosis secundaria y oclusión de vénulas intrahepáticas (57) La supervivencia postrasplante es aceptable, pero debe de tratarse la enfermedad primaria (58).

## 1.5 CONTRAINDICACIONES DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

Son muy pocas, las contraindicaciones absolutas, actuales para el trasplante hepático tanto médicas como quirúrgicas (59,60,). Enfermedades extrahepáticas graves, por ejemplo, pacientes con cirrosis pueden desarrollar hipoxia o hipertensión pulmonar, secundarias a síndrome hepatopulmonar, por la presencia de dilataciones vasculares intrapulmonares que se presentan entre el 10-13% de los cirróticos (Tabla III).

Anormalidades moderadas del intercambio gaseoso, no afectan el éxito del trasplante, sin embargo, pacientes con hipoxia severa o con presión auricular derecha  $>60\text{mmHg}$  tienen mortalidad muy alta perioperatoria, que se considera contraindicación del trasplante(61,62), así mismo los pacientes con enfermedad cardíaca, vascular, neurológica o renal grave, que tienen pocas posibilidades de sobrevivir, al menos que se realice un doble trasplante, hígado-riñón, o hígado-corazón-pulmón, que se reserva para pacientes jóvenes con patología hepática no cirrótica, como serían las anomalías congénitas, la enfermedad poliquística o la hiperoxaluria primaria, cuya sobrevida postrasplante es similar a la observada en el trasplante hepático aislado. La infección sistémica generalizada, sería contraindicación por el uso de altas dosis de inmunosupresión.

La existencia de tumor maligno fuera del hígado ya sea primario o metastásico, supone una contraindicación absoluta y permanente por el rápido crecimiento del mismo con tratamiento inmunosupresor. El haber tenido antecedente de neoplasia extrahepática no es una contraindicación si se ha cumplido un período de más de 5 años desde el control de la neoplasia hasta el trasplante (63). En los tumores

hepáticos, debe reservarse el trasplante hepático para aquellos pacientes con bajo riesgo de recidiva tumoral, postrasplante.

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida era contraindicación absoluta a principios de los 90's, sin embargo ya existen protocolos mundiales, aunque aún no hay suficientes datos publicados, que incluyen pacientes con VIH más cirrosis descompensada secundaria a virus, siempre que tengan una enfermedad estable con cuenta de CD4 por arriba de 200 células/mm<sup>3</sup>, y no han mostrado, hasta el momento, mayor rango de complicaciones que el resto de los pacientes trasplantados.

Desde el punto de vista quirúrgico ya no se consideran contraindicaciones absolutas la trombosis portal parcial o completa ya que si existe un vaso mesentérico o una vena mesentérica distal de calibre adecuado permeable, se coloca una anastomosis con la vena porta mediante un injerto venoso, que permiten restablecer la circulación(64). O el antecedente de múltiples cirugías y adherencias masivas. Actualmente no se consideran contraindicaciones absolutas. La tabla III describe las contraindicaciones generales y la tabla IV las específicas de trasplante hepático.

**Absolutas:**

- Enfermedades extrahepáticas graves, mortal a corto plazo
- Infecciones extrahepáticas graves
- Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**Relativas:**

- Adherencias masivas
- Trombosis portal completa
- Mal estado nutricional
- Insuficiencia renal
- Edad avanzada (mayor de 65 años)
- Antecedente de neoplasia extrahepática menor a 5 años
- Escasa posibilidad de seguir controles y tratamientos necesarios después del trasplante.

- **En pacientes con alcoholismo**

- período de abstinencia menor a 5 meses
- deterioro neurológico importante
- circunstancias socio-familiares muy desfavorables

- **En pacientes con infección por VHB**

- replicación viral activa: AgeVHB y/o DNA-VHB positivos  
( en pacientes tratados con lamivudina, AgeHB positivo con DNA-VHB negativos indica ausencia de replicación viral)

- **En pacientes con Hepatocarcinoma**

- nódulo único de diámetro mayor de 5 cms.
- multinodular, mas de tres nódulos o diámetro del nódulo mayor de 3 cms
- invasión tumoral de grandes vasos extrahepáticos
- metástasis extrahepáticas

## 1.6 EVALUACION DE LOS CANDIDATOS A TRASPLANTE HEPATICO:

Con objeto de establecer la indicación de trasplante hepático y de conocer si existen posibles contraindicaciones para el mismo, así como para obtener datos de interés para el período post-operatorio, en los pacientes candidatos a trasplante hepático, se debe realizar la siguiente evaluación:

a) Historia clínica y exploración física completos

b) Exámenes de laboratorio: hemograma completo

perfil bioquímico completo

perfil de coagulación completo

c) Evaluación en relación a Hepatopatía:

-Pruebas función hepática completas

-Marcadores virales:

.H BsAg y Anticore total

.Si éste es positivo: AgeVHB, AseVHB, DNA-VHB, y anti-VHD

.Anti-VHC . si es negativo y no se encuentra la etiología

.PCR-VHC

- Autoanticuerpos: AML, ANA, AMA, AMHR, EP

- Ferritina

- Ceruloplasmina

-Endoscopia de tubo digestivo alto

**-Valoración de permeabilidad portal:**

**.ECO-Doppler abdominal**

**.En caso de que ECO-Doppler sugiera trombosis portal**

**: arteriografía del tronco celiaco y mesentérica superior con  
retorno venoso .**

**d) Evaluación en relación a hepatocarcinoma estadiaje mediante:**

**- Ecografía abdominal**

**- TAC toraco – abdominal**

**- Arteriografía**

**- Gammagrafía ósea. Opcional: RMN.**

**- Otras pruebas analíticas, radiológicas e histológicas necesarias  
para confirmar el diagnóstico y establecer el estadio evolutivo de la  
hepatopatía.**

**e) Evaluación Cardiocirculatoria:**

**- ECG**

**- ecocardiograma: en pacientes con historia de alcoholismo, para  
descartar la presencia de miocardiopatía dilatada.**

**- edad > 60 años o sospecha de valvulopatía.**

**- en pacientes con cardiopatía isquémica o factores importantes de  
riesgo coronario: pruebas de esfuerzo o de estrés con dobutamina**

**- fondo de ojo.**

**- radiografía de abdomen (búsqueda calcificaciones arteriales).**

**f) Evaluación Respiratoria**

**- Radiografía de tórax**

- Pruebas de función respiratoria
- Gasometría arterial
- En caso de sospecha de síndrome hepatopulmonar o hipertensión pulmonar: pruebas adecuadas, de acuerdo con Anestesiología y Neumología.

f) Pruebas de Interés para la selección del donante de órganos y para la transfusión de Productos Hemáticos:

- Grupo ABO y Rh
- Anticuerpos anti-eritrocitarios irregulares.
- Anticuerpos anti-HLA circulantes.

g) Evaluación del Estado Basal Infeccioso: .

- Anticuerpos anti-HIV
- Anticuerpos anti-CMV
- Anticuerpos anti-EBV

- Anticuerpos anti-herpesvirus

- Anticuerpos anti-toxoplasma

- Serología luética

- Intradermorreacción a la tuberculina

- Exploración de posibles focos sépticos, especialmente bucales

h) Otras Pruebas: en pacientes alcohólicos:

- Evaluación alcohólica específica

- En pacientes con deterioro neuropsicológico evidente: TAC craneal

Una vez que el paciente es incluido en la lista de espera, sobreviene un problema:

La escasez de recursos en el ámbito sanitario y la existencia de las listas de

espera. Las cuales son un problema que afecta a la mayoría de los sistemas de salud, ya que ofrecen a sus ciudadanos un libre acceso al sistema sanitario pero a la vez disponen de recursos limitados; una de las consecuencias más importantes de la escasez de recursos es la necesidad de tomar decisiones sobre prioridades, es decir, establecer los criterios sobre quien tiene más derecho que otro.

En el caso de los trasplantes, a la escasez de recursos financieros común al resto de actuaciones en el ámbito de los cuidados de la salud, se une la escasez de órganos que junto con el aumento en las indicaciones de los trasplantes, debido al buen resultado de los mismos, son la causa de aumento en la listas de pacientes en espera de un órgano para ser trasplantado, esto conlleva una mortalidad de 15-20% en la lista de espera.

## **1.7 DISTRIBUCION DE LOS ORGANOS PARA EL TRASPLANTE**

### **1.7.1 MODELO ORGANIZATIVO ESPAÑOL**

Los principios de justicia distributiva y equidad presidirán el reparto de todos los órganos obtenidos para trasplante (24). Bajo este principio general deberá procederse a repartir los órganos basándose en criterios exclusivamente médicos, buscando la más idónea adecuación donante-receptor. Se utilizarán como principales criterios médicos: la necesidad médica del receptor y la probabilidad de éxito del trasplante. Siempre de acuerdo con los conocimientos científicos vigentes a cada momento, estado el profesional sanitario que lleve a cabo la selección del receptor siempre en disposición de justificarla. Por ejemplo, en España, la distribución de órganos se realiza en base a criterios clínicos y territoriales,

marcados por los representantes de las distintas comunidades autónomas en la sede del Consejo Interterritorial, el Modelo Organizacional Español incluye a la Organización Nacional de Trasplantes (ONT)(65), creada en papel, por resolución el 27 de junio de 1980, y con estructura física y personal a partir de 1989, basando su estrategia en un objetivo principal, la obtención de órganos para trasplantes, creando para ello una red de coordinación a tres niveles: Nacional, Regional y Local (22,25); La ONT, es una institución a nivel nacional que permite la armonización e integración de todos los esfuerzos realizados a nivel local. La relación permanente entre la coordinación nacional y las coordinaciones autonómicas y hospitalarias, así como con los profesionales de los diferentes equipos de trasplantes, ha sido sin duda, fundamental para alcanzar los excelentes resultados que se han obtenido en éste país, cada una de las 17 comunidades autónomas en España, tiene un representante en la Comisión Permanente de Trasplante de Órganos y Tejidos del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Esta comisión es el foro dónde se debate cualquier tema relacionado con el trasplante y que afecte a más de una comunidad autónoma. Cualquier discusión o acuerdo es aquí consensuado entre el coordinador nacional y los representantes autonómicos, así mismo, existe además una coordinación hospitalaria local, que es la responsable directa de la detección de donantes y de iniciar y coordinar todo el proceso que implica la conversión de donantes potenciales en donantes reales, éste red a logrado poner a España, en el primer lugar en el mundo en donación de órganos, teniendo 33.9 por millón de habitantes, siendo las comunidades de Cantabria y del País Vasco las que más contribuyen a éstas cifras (63.5 y 50.2 por millón de habitantes. respectivamente )

### 1.7.2 MODELO ORGANIZATIVO AMERICANO: UNOS

En Estados Unidos la UNOS (United Network for Organ Sharing) es un organismo privado, no lucrativo, bajo supervisión del gobierno, que implementa políticas en un Sistema Nacional de Salud relacionado con el Trasplante, en 1986 el gobierno federal le permitió operar la red nacional de Procuramiento de Órganos y Trasplante (OPTN: Organ Procurement and Trasplantation Network)(66,67), a partir de 1987 se mantiene una base de datos de todos los órganos procurados, así como todos los receptores de trasplante y programas de trasplante en Estados Unidos, se divide en 11 regiones geográficas, cada región tiene un representante en las 39 juntas directivas. Datos recientes revelan 22.3 donaciones por millón de habitantes en Estados Unidos de Norteamérica (67,68)

El estado del paciente se determina por un sistema que se basa en la severidad de la enfermedad hepática, clasificado como

**Estadio I:** Aquellos pacientes con hepatitis fulminante, con 8 semanas del inicio de los síntomas y uno de los siguientes datos:

- Estadio 2 de encefalopatía
- Bilirubina >15 mg/dl
- INR >2.5
- Hipoglicemia (nivel de glicemia < 50 mg/dl)

Disfunción Primaria del Injerto trasplantado en los últimos 7 días

Trombosis de la arteria hepática, ocurriendo en los primeros 7 días del trasplante

Enfermedad de Wilson aguda descompensada

**Estadio II A:** Pacientes con enfermedad crónica del hígado, con una etapa funcional Child-Pugh  $\geq 10$  hospitalizados en la Unidad de Terapia Intensiva con una esperanza de vida menor a 7 días sin trasplante con al menos uno de los siguientes criterios:

- Hemorragia Variceal Activa sin respuesta a manejo, con falla o contraindicación quirúrgica o falla a colocación de TIPS
- Síndrome Hepatorenal
- Ascitis refractaria /Síndrome Heparrenal ( Hidrotórax hepático)
- Estadio 3 o 4 de Encefalopatía Hepática, que no responde a terapéutica.

**Estadio II B:** Pacientes con enfermedad crónica hepática y una etapa funcional Child -Pugh  $\geq 10$  o  $\geq 7$  y una de las siguientes consideraciones clínicas:

- Hemorragia variceal activa sin respuesta a manejo
- Síndrome Hepatorenal
- Peritonitis Bacteriana Espontánea
- Ascitis Refractaria /Síndrome Heparrenal (Hidrotórax)

Los pacientes con carcinoma hepatocelular, pueden registrarse en estadio Ib

si cumplen los siguientes criterios:

- Nódulo único  $\leq$  a 5 cms
- Tres o más nódulos  $\leq$  3 cms
- Que no sea candidato a resección quirúrgica
- Que no exista invasión metastásica ni permeación vascular.

**Estadio III:** Pacientes con enfermedad crónica hepática y una clasificación de Child-Pugh  $\geq$  a 7.

**Estadio VII:** paciente con Hepatopatía crónica inactivo temporalmente (66).

### 1.7.3 OTROS MODELOS ORGANIZATIVOS

Otros sistemas como **EUOTRASPLANT**, grupo que incluye los países de Alemania, Austria, Bélgica, Luxemburgo y Holanda dónde existe una lista única y el criterio de distribución se basa en puntaje de acuerdo a la severidad del estado actual de cada paciente.; existe el (**SKT: SCANDIATRASPLANT**) que incluye países como Dinamarca, Finlandia, Noruega y Suecia y el **SWT:** Organización Suiza de Trasplantes. En México existe **CONATRA:** Consejo Nacional de Trasplantes y la **COETRA:** Consejo Estatal de Trasplantes.

La distribución de órganos para trasplante es una preocupación constante de todos los países y de todas las organizaciones de trasplante, esto hace que existan muchas y diversas fórmulas de distribución, el problema radica en encontrar el mejor.

## 1.8 INMUNOSUPRESION

### 1.8.1 CICLOSPORINA

Una vez que se ha logrado realizar el trasplante existen otras problemáticas: el tipo de inmunosupresor idóneo de acuerdo a la causa que llevó al trasplante. Existen dos inmunosupresores básicos, inhibidores de la calcineurina: La ciclosporina y el tacrolimus. La CsA es un potente inmunosupresor aislado de dos cepas de hongos (*Cyindrocarpon lucidium* y *Tolyposcladium infatum gams*) fue descubierto por Borel en 1972 (70), y sobre todo cuando aparece su presentación en microemulsión Neoral, ya que tiene mayor bioabilidad y absorción más consistente, el trasplante cobró una mayor importancia, ya que permitió hacer del trasplante una realidad. La CsA es un agente específico de linfocitos y actúa en los estadios tempranos de activación del sistema inmune, formando un complejo ciclosporina-ciclophilina con la calcineurina e inhibiendo la activación de los linfocitos T y con mínima actividad contra los linfocitos B. Bloquea la transmisión de la respuesta mediada por antígenos, a través de inhibir la producción de interleucina 2, la cual es un factor indispensable para la inducción de linfocitos T citotóxicos en respuesta a un antígeno.(70,71,72)

### 1.8.2 TACROLIMUS

El Tacrolimus fue introducido al principio de los noventas, es un inmunosupresor muy potente, 10 a 100 veces más potente que la CsA (73), tacrolimus (FK506, Prograf) es un antibiótico macrólido derivado del hongo *Streptomyces tsukubaensis*, tanto la CsA como el FK tienen efecto inhibitorio en la activación

de los linfocitos T, se enlazan a diferentes proteínas llamadas inmunofilinas, la ciclosporina se enlaza a la ciclofilina y el tacrolimus se enlaza a la proteína FK506 forma un complejo que inhibe la calcineurínfosfatasa. Una de las sustancias de la calcineurínfosfatasa es un factor de transcripción llamado el factor nuclear de las células T activadas (NF-AT) el cual es necesario para la expresión de los genes de citocina, bloquea la expresión de citocina y previenen una respuesta inmune. La ciclosporina se usa a dosis de 10-15mg/Kg de peso y el Tacrolimus a 0.1- 0.3mg / Kg /día, vía oral, tiene la habilidad de requerir menor dosis y por menos tiempo de esteroides y por lo tanto disminuir los efectos secundarios causados por los esteroides(74) Otras Inmunofilinas, complejos y proteínas enlazantes están presentes dentro de la célula, por lo tanto existen algunas diferencias entre el tacrolimus y la ciclosporina, por ejemplo: el sitio de enlace de los esteroides existe en el citoplasma como un complejo, la presencia de esteroides causa disociación de el receptor de esteroides que se mueve al núcleo y se enlaza a DNA. Parte de éste complejo es una proteína FK-enlazante, y como es la misma proteína a la que se enlaza el tacrolimus, en presencia de éste último, la afinidad de los esteroides se ve reducida, éste se piensa es el mecanismo de liberación de esteroides dado por el tacrolimus (74,75). En los estudios multicéntricos randomizados que se han llevado a cabo tanto en Estados Unidos como en Europa, ambos concluyen, que al parecer, el tacrolimus se asocia a menos episodios de rechazo agudo, rechazo refractario o corticoresistente, sin embargo existen mayor cantidad de efectos adversos asociados al uso de tacrolimus que requirieron discontinuación de la droga. (76) Los efectos secundarios principales que provocan ambos son:

Nefrotoxicidad, Neurotoxicidad, Hipertensión y Diabetes Mellitus y son atribuidos en parte al bloqueo calcineurínico (76,77).

### 1.8.3 NUEVOS INMUNOSUPRESORES

**1.8.3.1 El Micofenolato Mofetil:** su forma activa es el ácido micofenólico, inhibe la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMP), enzima que facilita la conversión de IMP a xantósina monofosfato, la inhibición de IMP deshidrogenasa repleta los nucleótidos de guanina. La depleción de guanosin monofosfato bloquea la síntesis de DNA. Aunque el mecanismo preciso no es claro, el uso inicial del ácido micofenólico en el trasplante se basó en un mecanismo posiblemente similar a la mizoribina, inmunosupresor usado en Japón desde los 80's, los principales efectos adversos de la fórmula, son 75% síntomas gastrointestinales como son: náusea, diarrea y calambres abdominales, así mismo hematológicos como anemia y leucopenia, su principal ventaja es que no es nefrotóxico, y se usa aunado a un inhibidor de la calcineurina cuando este tiene que disminuirse por nefrotoxicidad, se complementa el efecto inmunosupresor con su uso. (78)

**1.8.3.2 El Sirolimus:** (Rapamicina; Rapamune) la cual es una lactona macrocíclica aislada del *Streptomyces hygroscopicus* reduce la activación de las células T en un estadio tardío en el ciclo celular al inhibir la vía de traducción inducida por citoquinas, resultando en supresión de IL-2 o IL-4 que conducen a proliferación de células T, tiene una vida media de 2.5 días permitiendo solamente una aplicación al día, similar a CsA y a Tacrolimus, su vía de eliminación es a

través del sistema enzimático citocromo CYP3A4. No es nefrotóxico, ni neurotóxico ni provoca hipertensión. Se ha usado en asociación con Mycophenolato Mofetil como prevención del rechazo agudo en trasplante renal con resultados similares a la ciclosporina pero con margen de seguridad diferente (79, 80, 81, 82) Se han usado además terapias de inducción para minimizar la nefrotoxicidad como son:

**1.8.3.3 Los Anticuerpos Monoclonales** (murinos, quiméricos y humanizados) preparados antilinfocíticos, actúan en la cadena  $\alpha$  de la IL-2R y han mostrado ser efectivos y seguros en prevenir el rechazo agudo tenemos el daclizumab anticuerpo humanizado de los anticuerpos monoclonales murinos, ha mostrado en receptores de trasplante renal disminuir el rechazo agudo sin añadir toxicidad al régimen inmunosupresor (83).

## 1.9 FIBROGENESIS HEPÁTICA Y FACTOR TRASFORMANTE DE CRECIMIENTO BETA (TGF $\beta$ ).

La fibrosis hepática, es actualmente un proceso reversible, es una respuesta a curación de heridas caracterizada por la acumulación de matriz extracelular que sigue a las formas crónicas de las enfermedades hepáticas(85,86). El principal evento, es decir, el evento central en la fibrosis hepática, es la activación de las células estrelladas, conocidas previamente como lipocitos, células ito, células perisinusoidales, o células almacenadoras de grasa. Estas células perisinusoidales provocan una serie de cambios incluyendo la degradación de los componentes de matriz extracelular normales, depósito

de escara, contracción vascular y orgánica y la liberación de citocinas. Se considera que no sólo la fibrosis es reversible, al parecer cada vez se demuestra más que la cirrosis también puede ser reversible. Sin embargo el estadio exacto en que la fibrosis /cirrosis se hace irreversible, es desconocido. La función principal de la célula estrellada es el almacén de vitamina A y mantenimiento de los componentes de matriz normales, los cuales son: colágenos, glicoproteínas no colágenas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y proteínas de matriz (89,91); al ocurrir una lesión hepática, las células estrelladas llevan a cabo una activación, en el cual existe pérdida de la vitamina A y se transforma en una célula altamente proliferativa con síntesis de componentes de matriz ricos en colágena tipo 1. Se transforma a miofibroblastos, proliferativos, fibrogénicos y contráctiles.(87,88,89,90,91)

La activación de las células estrelladas consta de dos fases: ,**iniciación**, también llamado estado preinflamatorio, caracterizados por cambios en la expresión de genes, con estimulación parácrina de una serie de células incluyendo células de Kupffer, hepatocitos, plaquetas, leucocitos y células endoteliales que participan en la activación al producir fibronectina y al activar al factor transformante de crecimiento (TGF $\beta$ ) de la forma latente a la forma activa , (forma profibrogénica) .

Los mayores cambios fenotípicos después de la activación, constituyen la fase de **perpetuación** (84): incluyendo la proliferación de las células estrelladas estimulado por el PDGF, la contractilidad dada principalmente por la endotelina 1 (ET-1), la fibrogénesis que tiene como exponente principal el

TGF $\beta$ 1 (figura 1), la pérdida del retinoide almacenado perinuclear y la quimioatracción tanto de leucocitos (neutrófilos que son una importante fuente de ROS) como de citocinas especialmente el TGF $\beta$  y la degradación de matriz, ya que las células estrelladas no sólo influyen en la producción de la matriz, sino también en su degradación a través de una gran familia de metaloproteinasas especialmente la gelatinasa MMP-2, -9 que a su vez también estimulan al TGF $\beta$ .

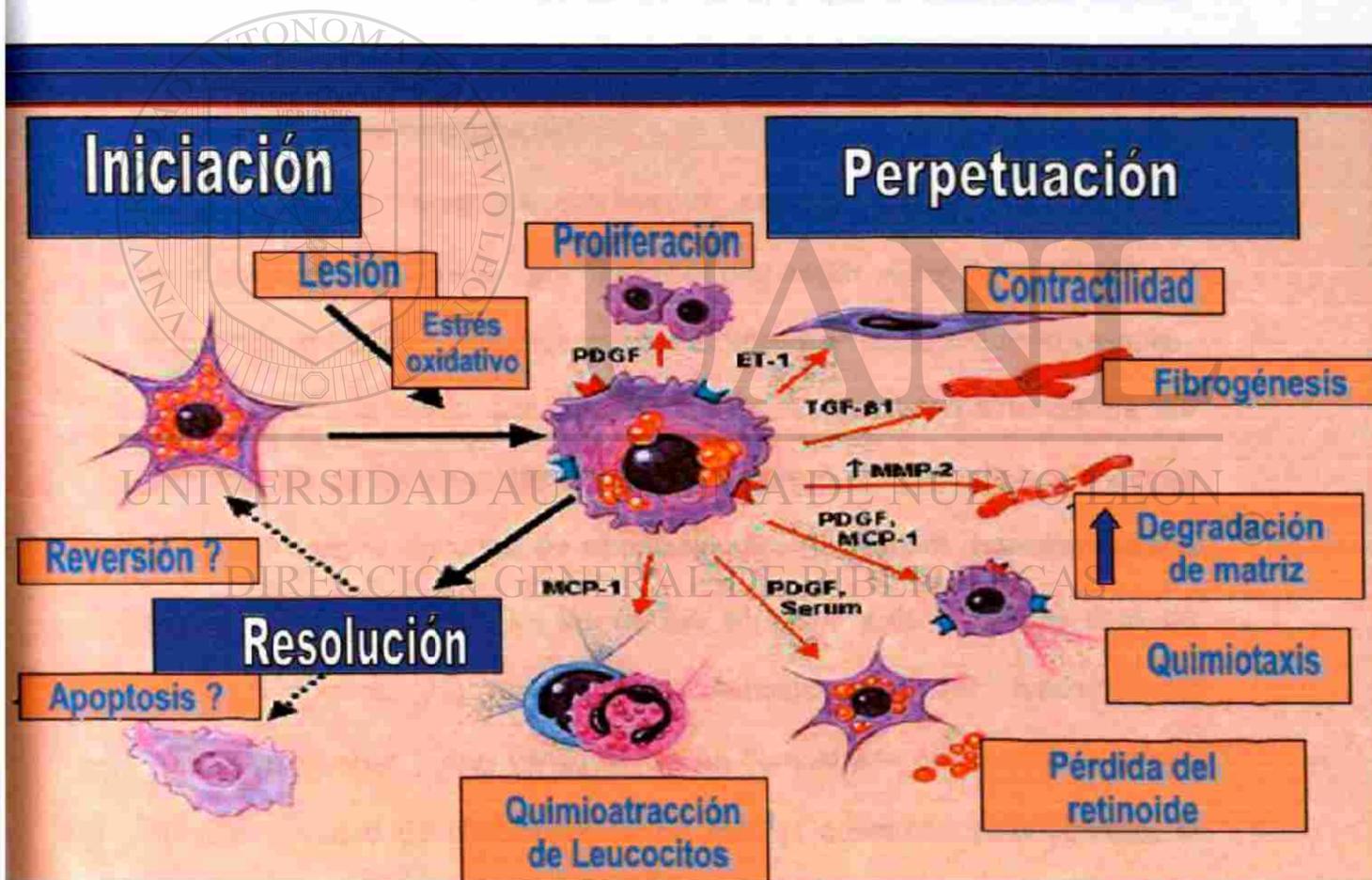


Figura 1. Características fenotípicas de la activación de la célula estrellada durante una lesión hepática y su resolución.

Las células de Kupffer también estimulan, la proliferación celular y la liberación de retinoides de las células estrelladas a través de la acción de las citoquinas especialmente el TGF $\beta$  .(85,86)

Se ha implicado al sistema de renina-angiotensina-aldosterona , con su principal molécula efectora, la angiotensina II, contribuyen a la progresión de fibrosis, en modelos animales, ya previamente se había reportado que el heredar el genotipo altamente productor de angiotensinógeno, está asociado a fibrosis más severa en hepatitis crónica C, y que el tratamiento con un inhibidor de la angiotensina II, disminuye la fibrosis hepática, la inflamación hepática y la esplenomegalia.(91)

El TGF $\beta$  es un factor de crecimiento, es una citocina multifuncional, determinada genéticamente, producida por una amplia variedad de células incluyendo, monocitos, linfocitos, células tubulares renales, endotelio vascular, epitelio de la vía aérea que se trasporta en la circulación a través de los

gránulos alfa de las plaquetas (92,93,94). Es un polipéptido de dos cadenas de 25,000 daltons. Estudios de hibridación por Northernblot han demostrado que el TGF $\beta$  forma parte de las células normales y de diferentes tipos de células tumorales. (92). Aunque se ha demostrado que las funciones del TGF $\beta$  son muchas y muy variadas, se ha demostrado que está involucrado en una variedad de situaciones como son: el desarrollo embriogénico, la tumorigénesis, la fibrosis, la reparación de heridas y la inmunoregulación de la respuesta inmune(94).

Las funciones del TGF $\beta$  dentro del sistema inmune son:

- a) Es producido y secretado por una variedad de células inmunes
- b) Inhibe la proliferación de los timocitos, células T, células B y las células asesinas naturales
- c) Inhibe la generación de los macrófagos citotóxicos
- d) Inhibe la producción de IgG e IgM
- e) Cambia a las células B de la producción de IgA a IgG
- f) Modula la producción de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  , IL-1 $\beta$
- g) Funciona como quimioattractante de monocitos y neutrófilos.

Todos éstos efectos sobre el sistema inmune han demostrado tanto en trasplante cardíaco como en el trasplante de células de los islotes de Langerhans, que al administrarse TGF $\beta$  recombinante intraperitoneal, prolonga la supervivencia del injerto cardíaco en el ratón y prolonga la vida de los islotes de Langerhans, por lo que la modulación de ésta citocina puede ser un concepto útil para la mejoría de la supervivencia del injerto.(97,98)

Tiene 3 isoformas TGF $\beta$ 1, 2 y 3 siendo la TGF $\beta$ 1 la isoforma implicada en la fibrogénesis hepática(94,112). El TGF $\beta$  tiene efecto en la reparación de tejido y en la fibrosis (99,100). Al estudiar la expresión de los mRNA de las tres isoformas de TGF $\beta$  se ha visto que se encuentra incrementado en la regeneración hepática, y su expresión se presenta en las células hepáticas no parenquimatosas, especialmente en la isosforma del TGF $\beta$ 1 ya que se observó un incremento de 8 a 10 veces más que la isoforma del TGF $\beta$ 2.(101)

Los hepatocitos de lo hígados en regeneración son capaces de activar la forma latente del TGF $\beta$ 1 *in vitro*, mientras que los hepatocitos normales no lo

hacen (99). Las células parenquimatosas y no parenquimatosas del hígado normal contienen cantidades indetectables de  $\text{RNAmTGF}\beta$ . Después de una lesión hepática la transcripción del  $\text{TGF}\beta$  se hace en células parenquimatosas y no parenquimatosas, encontrándose en éstas últimas un incremento de 5 veces mayor. En el hígado de las ratas crónicamente tratadas con tetracloruro de carbono el incremento del  $\text{RNAmTGF}\beta$  sólo se encontró en células no parenquimatosas(101,102). Esto mismo se demuestra en el estudio del Dr. Bisell(105) ya que el  $\text{TGF}\beta$  liberado de las células hepáticas está en forma latente, mientras que las células no parenquimatosas liberan el 50-90% de la forma activa del  $\text{TGF}\beta$ , estimulados predominantemente, si no exclusivamente por un modo de acción autócrino. El  $\text{TGF}\beta$  también podría alterar el comportamiento de las células cancerosas, esto debido a que los cambios producidos en las líneas celulares cancerosas tratadas con ciclosporina eran revertidos cuando era añadido un anticuerpo que enlazaba y por lo tanto bloqueaba la acción del  $\text{TGF}\beta$ .(93,103).

En las células normales el  $\text{TGF}\beta$  actúa, bloqueando el ciclo celular en la etapa G1, para inhibir la proliferación, inducir diferenciación o promover la apoptosis, sin embargo en las células tumorales favorece el desarrollo tumoral, ya que durante la transformación de una célula normal a una célula cancerosa, en la cual la proliferación es no regulada, varias de las acciones del  $\text{TGF}\beta$  están mutadas, por lo que la célula tumoral es resistente a los efectos del mismo  $\text{TGF}\beta$ . Las células cancerígenas incrementan la producción de  $\text{TGF}\beta$ , el cual actúa en las células del estroma que rodea a las células tumorales, las células

del sistema inmune, las endoteliales y las del músculo liso causando inmunosupresión y angiogénesis incrementando la invasividad del tumor(93)

Los efectos del TGF $\beta$  sobre las células no están en unión del péptido por sí mismo, sino por el conjunto de los factores de crecimiento y sus receptores que operan en las células en un momento dado(104,105,106).

Se considera crucial para el desarrollo de fibrosis hepática ya que favorece la fibrogénesis a través de su efecto estimulador sobre las células estrelladas, que son las células que más contribuyen a la producción y depósito de colágeno en diferentes procesos patológicos hepáticos, aumenta la producción de proteínas de matriz extracelular y sus receptores, inhibiendo su degradación por enzimas proteolíticas, por lo que impide los procesos colagenolíticos (89,90,91,107). Se ha implicado la asociación de TGF $\beta$  y el grado de fibrosis hepática, en modelos animales por varios autores: Czaja y cols, (98) Nakatsukasa y cols (99) y Castilla y cols(100) demostrando un

---

aumento de 2 a 14 veces mayor que en controles normales del RNAm TGF $\beta$ 1 en pacientes con enfermedades crónicas del hígado; y su actividad se relaciona estrechamente con el RNAm de la procolágena I y III (100,105).

El TGF $\beta$  es un polipéptido que actúa como un inmunosupresor y prolonga la supervivencia del injerto cuando es administrada en conjunto con el trasplante de órganos, posiblemente represente un tipo de inmunosupresión endógena, al mismo tiempo tiene un efecto contrario al estimular el depósito de matriz extracelular resultando en fibrosis.(97,114,115,128,129,130)al parecer la ciclosporina incrementa la secreción de TGF $\beta$ 1, se demuestra el

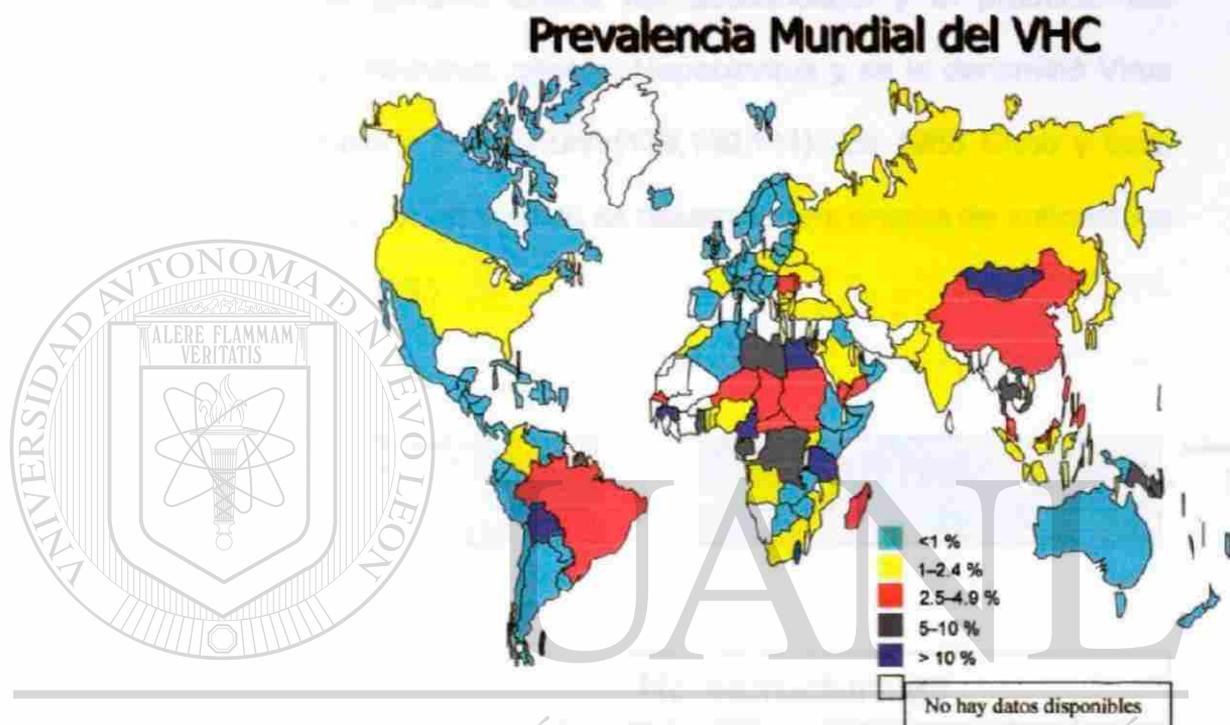
incremento de 2 a 4 veces más en el  $\text{RNAmTGF}\beta 1$ , así como prolongación de su vida media en respuesta a ciclosporina (95,96).

### 1.10 VIRUS C: EPIDEMIOLOGIA

El virus de la Hepatitis C tiene distribución universal, es un problema de salud a nivel mundial, donde se estima que alrededor de 50 millones de personas están infectadas en el mundo, 5 millones en Europa, y publicaciones recientes de la Dra. Miriam Alter y cols (134,135,136) del centro de control y prevención de enfermedades en los Estados Unidos de Norteamérica, reportan que alrededor de 4 millones de personas tienen anticuerpo contra el virus de hepatitis C positivo en EEUU., lo cual nos indica exposición al virus. Tres cuartas partes de éstos pacientes tienen RNA VHC detectable lo que nos habla de infección crónica; desde el punto de vista epidemiológico su prevalencia varía entre el 1 – 25%, siendo en la mayor parte de los países entre 1- 2.5%. Existen países donde la prevalencia es mayor, así tenemos a Egipto, cuyo rango de prevalencia es el mayor del mundo, alrededor

del 25% (137) sobretodo en la región del Valle del Nilo, donde los rangos de infección son mayores comparados con las áreas urbanas y desérticas. La epidemia del VHC en Egipto fue el resultado de las campañas de vacunación contra la esquistosomiasis. De los años 1920 a 1980, el gobierno administró terapia antiesquistosomiasis (de 6 a 12 inyecciones) con jeringas reusables. El intervalo entre cada aplicación inyectable era de 2 a 4 semanas, si un individuo se

infectaba al inicio del tratamiento, podría transmitir el VHC a los otros que usaban la misma jeringa (figura 2).



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 2. Prevalencia Mundial del virus de Hepatitis C .**

Durante la época de los 70's y 80's no se había podido identificar el virus causal de las hepatitis postrasfusionales. Se atribuía el 25% de los casos a virus B, y el 75% de los mismos a lo que se le nombró hepatitis no A-no B. El agente etiológico de ésta hepatitis permanecía siendo un enigma, hasta que investigadores de un Laboratorio privado: Corporación Chiron, usando técnicas avanzadas de biología

molecular, hicieron estudios en grandes volúmenes de plasma de chimpancé del Centro de Control y Prevención de Enfermedades en EE.UU (138).

Ellos extrajeron el RNA, clonaron éste a un vector de expresión y expusieron el producto expresado a suero inmune. De los millones de clones estudiados uno solo resultó positivo, el genoma entero fue secuenciado y el producto fue identificado como de tipo flavivirus, género: Hepacivirus y se le denominó Virus de hepatitis C, virus cubierto de 30-60nm(139,140,141). En 1988 Choo y cols, caracterizaron el virus C y posteriormente se desarrolló una prueba de anticuerpos para detectar la infección (138)

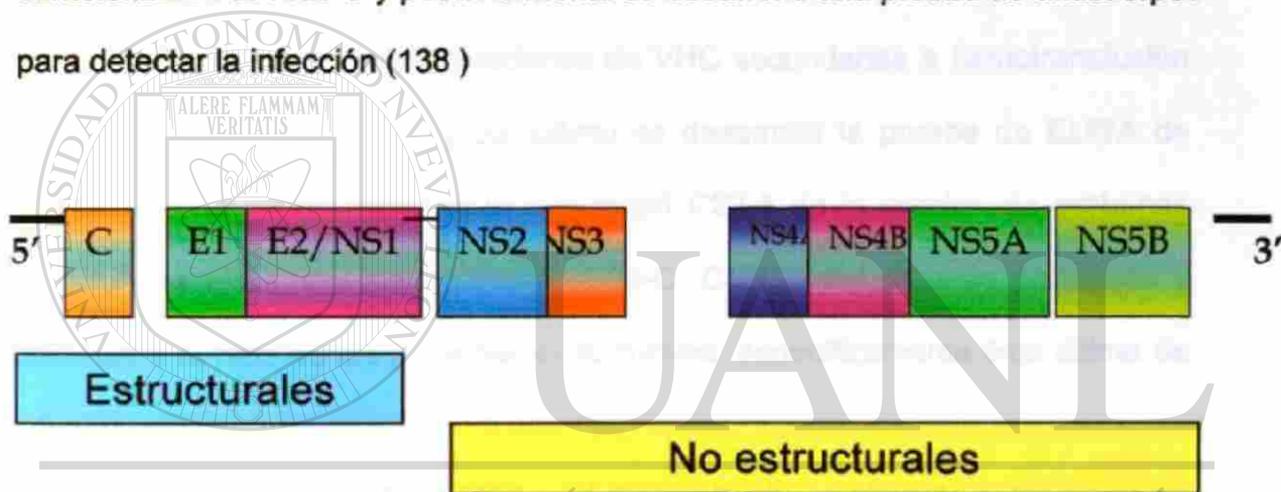


Figura 3. El Genoma del Virus de la Hepatitis C.

### 1.10.1 HISTORIA NATURAL VHC

La mayor parte de las infecciones agudas son asintomáticas entre el 60-75% de los casos, 20- 30% presentan ictericia y 10-20% presentan fatiga, náuseas y vómitos; 10-20% se resuelven espontáneamente y curan y 60-90% pasan a hepatitis crónica: con elevación recurrente de las transaminasas por más de 6 meses, de los cuales un 20% desarrollan cirrosis hepática y 3-5 % por año desarrollarán carcinoma hepatocelular.

### 1.10.2 PRUEBAS DIAGNOSTICAS VHC

En Mayo de 1990 apareció la primera generación de ELISA EIA-1 fue utilizada en los donadores de sangre detecta la fracción del virus C correspondiente a proteínas no estructurales C100-3 , esto logró prevenir alrededor de 40,000 infecciones de VHC dentro del primer año en EEUU, posteriormente se desarrolló la prueba e ELISA de segunda generación, que detecta la porción de proteínas estructurales C22-3 del VHC y la fracción C200 de las proteínas estructurales, lo cual ha reducido las nuevas infecciones de VHC secundarias a hemotransfusión prácticamente a cero (142 ) y por último se desarrolló la prueba de ELISA de tercera generación que detecta la subunidad C22-3 de la porción de proteínas estructurales el virus y las fracciones C33-C, C100-3 del área de proteasas y helicasas y la NS5 de las proteínas estructurales, específicamente ésta última de la función polimerasa.

El descubrimiento del VHC en 1989, y el desarrollo de pruebas de anticuerpos en 1989, fue el primer paso para la identificación de la causa de enfermedades hepáticas relacionadas a transfusión de productos hemáticos, desde entonces la sensibilidad y especificidad de las pruebas se han ido incrementando, lo que ha hecho segura la sangre que se trasfunde con riesgo de 0.001% por unidad trasfundida.(143)

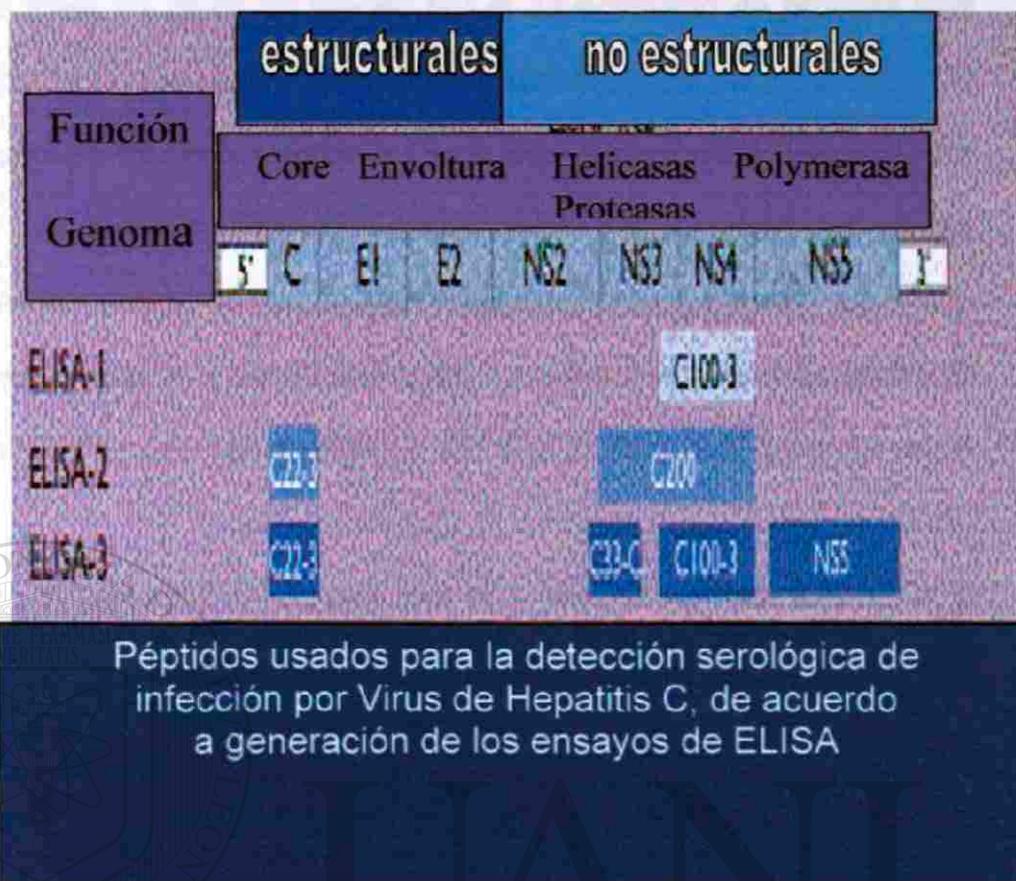


Figura 4. Péptidos usados para la detección serológica de infección por VHC, por el método de ELISA.

El problema mayor con las pruebas de ELISA es el bajo valor predictivo positivo y alto rango de falsos positivos, en poblaciones con baja prevalencia (Ej. Donadores de sangre, pacientes con transaminasas normales y aquellos pacientes sin factores de riesgo conocidos). En ésta población una prueba de ELISA positiva deberá ser confirmada con una prueba de Inmunoblot reversa (RIBA 2 o 3) también conocidas como " Western blot "(143). El nuevo RIBA 3 detecta anticuerpos a cada una de las proteínas del virus C (core, NS2 a la 5).

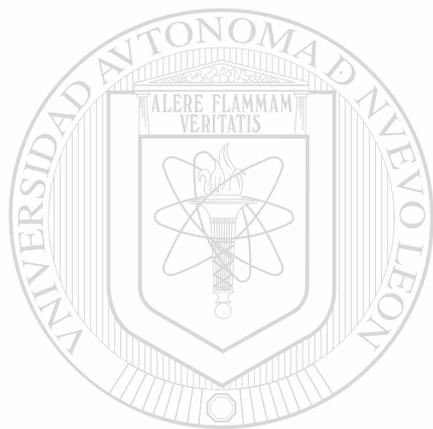
Actualmente el RIBA ha caído en desuso por el advenimiento de pruebas más sensibles y específicas que se describen a continuación.

El mejor marcador de viremia e infectividad es la determinación del RNA VHC por PCR cualitativo, el ensayo cualitativo es más sensible que el cuantitativo, ya que detectan cantidades muy pequeñas de RNA viral (145). Incluso durante "el período de ventana", que es desde la exposición al VHC y la presencia de anticuerpos. El RNA VHC por PCR puede ser detectable de 1 a 2 semanas después de la exposición.

El RNA VHC PCR Cuantitativo es usado por dos razones: 1) Para cuantificar la cantidad de virus en un paciente candidato a terapéutica y 2) para observar el grado de declinación de la carga viral posterior a tratamiento, sobretodo a las 12 semanas postratamiento para decidir continuar o retirar la terapéutica. Aunque la cantidad del virus no se correlaciona con los niveles de transaminasas (144,145), ni con el grado de lesión histológica (146,147), tener una carga viral de base nos sirve de predictor para la respuesta al tratamiento.

Existen varios métodos para la cuantificación del virus, pero para estandarizar los resultados obtenidos entre las diferentes técnicas de biología molecular en la detección de VHC, recientemente se ha establecido la estandarización universal de las unidades de cuantificación del RNA-VHC que ha resultado en la cuantificación estándar internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) aceptándose como estándar una muestra liofilizada del genotipo 1 del VHC con una concentración de 50,000UI por ml. Esta muestra se reconoce como el primer Estándar Internacional para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos para el RNA VHC, conocido como estándar OMS 96/790. Existen

diferentes técnicas de amplificación, siendo la más sensible el Monitor versión 2.0 con un límite de detección mínima de 100 copias /al (50UI/mL), el Quantiplex HCV 2.0 de (Bayer Diagnostics), mínima detección 200,000 Eq/ml, el NASBA (Organon Tekinaka). Existen otros métodos como es la determinación de bDNA, cadena ramificada de DNA (Chiron) y la cuantificación en tiempo real que es el Light Cycler, que aún está en investigación (134). Los ensayos moleculares para la detección del RNA-VHC se muestran en la tabla V.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**METODOS CUALITATIVOS**

<b>Versant RNA_VHC</b>	<b>50 copias/mL(&lt;10UI/mL)</b>
<b>TMA ( tiempo real)</b>	<b>5- 10 UI/mL</b>
<b>Cobas Amplicor 2.0 (Roche)</b>	<b>103 copias /mL (5-10 UI/mL)</b>
<b>Caseras PCR (Trizol)</b>	<b>5-10 UI/mL</b>

**METODOS CUANTITATIVOS**

<b>Cobas Amplicor Monitor v2.0 (Roche)</b>	<b>100 copias/mL (50UI/mL)</b>
<b>Quantiplex 2.0b DNA (Bayer)</b>	<b>200-3500 copias/mL</b>
<b>b DNA 3 Gen</b>	<b>2000 a 3500 copias/mL</b>
<b>Superquant HCV (National Genetics Institute)</b>	<b>100 a 5 x 10<sup>6</sup> copias/mL</b>
<b>PCR en tiempo real</b>	<b>10 copias/mL</b>
<b>TMA</b>	<b>50 copias /mL</b>
<b>Light Cyclcr</b>	<b>en investigaci3n</b>

## 1.11 TRASPLANTE HEPATICO Y VHC

### 1.11.1 HISTORIA NATURAL DE LA RECIDIVA C POSTRASPLANTE

La Cirrosis Hepática secundaria al virus de la Hepatitis C es la causa más frecuente de trasplante hepático en la actualidad (148). No obstante, prácticamente todos estos pacientes presentan recidiva de la infección por VHC después del trasplante (149). La recidiva es universal presentándose entre el 98 al 100% de los pacientes.

Los estudios sobre cinética viral en la recidiva del virus C postrasplante de Fukumoto y cols. Publicados en 1996 demostraban que, en el período postrasplante inmediato, la carga viral disminuye hasta hacerse indetectable en los primeros días del trasplante, pero a partir de 2º al 9º día se demuestra la reinfección por virus C en el 95-100% de los pacientes, existiendo a partir de la segunda semana postrasplante una rápida elevación de la carga viral en sangre hasta alcanzar un pico entre el primer y sexto mes, que coincide con la aparición de elevación de transaminasas (150). Sin embargo recientes comunicaciones han demostrado la detección de RNA viral tanto durante la intervención (fase anhepática y reperusión) como en el período postrasplante inmediato. Tras un descenso acusado de la carga viral, después de la reperusión se produce un aumento progresivo de la concentración del RNA viral en las 12 primeras horas del trasplante, lo que sugiere que la replicación comienza de forma precoz en el nuevo injerto (151) sugiriendo que en las primeras 24 horas postrasplante podría ser la mejor alternativa para controlar el virus. La tabla VI muestra como diferentes autores han estudiado la historia natural de la recidiva del virus C postrasplante mostrando que el desarrollo de cirrosis a los 5 años postrasplante varía entre un 3

% hasta un 33%.(152-159 ). Esto nos traduce que el desarrollo de la fibrosis en éstos pacientes está acelerada y evoluciona en un período de tiempo corto.

**Tabla VI. Historia Natural de la Recidiva del virus de Hepatitis C Postrasplante**

	No.pacientes Trasplante Hep.	Sobrevida	% Cirrosis/tiempo en años
Feray,1994 (152)	79 VHC 106 Control	72% = 1 año 80% = 5 años	61%hepcrónica / 3 3% cirrosis / 3
Gane,1996 (153)	149 VHC 623 Control	79% = 1 año 70% = 5 años	90% hepcrónica / 5 20% cirrosis / 5
Boker,1997 (154)	71 VHC 474 Control	69% = 1 año 62% = 5 años	82% hepcrónica / 5 3% cirrosis / 5
Prieto,1999 (155)	81 VHC	95% = 1 año 84% = 5 años	3.7% cirrosis / 1 28% cirrosis / 5
Feray,1999 (156)	652 VHC	72% = 5 años	80% hepcrónica/ 5 10% cirrosis / 5
Berenguer,2000 (157)	284 VHC	74% = 1 año 81% = 5 años	Fibrosis / año =0.3(0.001) 31% cirrosis / 5

Testa,2000 (158)	300 VHC	80.6% = 1 año  61% = 5 años	6% cirrosis / 5
Rimola ,2002 (159)	122 VHC	95% = 1 año  85% = 5 años	33% cirrosis / 5 5% Hepatitis colestásica fibrosante

En la mayoría de casos, la recidiva de la infección C se asocia a lesión significativa del injerto, la cual generalmente adopta el patrón clásico de hepatitis aguda seguida de hepatitis crónica con eventual progresión a cirrosis (161,162,163). La historia natural de la recidiva C postrasplante se muestra en la Figura 5, donde observamos que posterior el trasplante, existe recidiva de manera universal entre el 98 al 100% (153,164,165), esto se ha demostrado al medir el RNA VHC en el suero de pacientes trasplantados por diferentes grupos, de investigadores donde se demuestra por reacción de transcriptasa reversa PCR, en el periodo postrasplante inmediato en ausencia de daño histológico, sin embargo no es sorprendente porque todos los pacientes presentaban viremia pretrasplante. No es claro si ésta baja carga viral representa virus residual que permaneció silentes dentro del circulación, o sea secundaria a un nivel de replicación bajo dentro del injerto. Posteriormente entre el segundo al cuarto mes postrasplante el 25 al 45% de los pacientes desarrollan un cuadro de hepatitis aguda, y el periodo entre los 3 meses y los siguientes 5 años, desarrollo de hepatitis crónica en el 80 al 100% de los pacientes, y de un 3 al 33% de los mismos desarrollo de cirrosis; se ha reportado la presencia de hepatitis colesásia fibrosante entre el 2 y el 8% de

los pacientes (166). Se han implicado una serie de factores que provocan éste desarrollo de fibrosis acelerado. Se postulan :

1) Factores relacionados al virus: dónde tenemos a) la carga viral; los niveles de viremia pretrasplante (168) postrasplante (162), pueden predecir la severidad de la hepatitis en el injerto. En cirrosis hepática secundaria a virus C el riesgo relativo de pérdida del injerto es 3.6 veces mayor en el grupo de pacientes con cargas mayores a 1 millón mEq/mL, y con sobrevida de 57% contra el grupo de baja carga viral con sobrevida de 84% a 5 años respectivamente. b) el genotipo: se ha implicado al genotipo 1 y sobretodo al 1b, con enfermedad postrasplante más agresiva, y con asociación a lesiones apoptóticas más severas(167) y c) quasciespecies, que corresponde a la heterogeneidad genética dentro de un individuo infectado como resultado de una infección de novo. Población viral heterogénea como resultado de mutaciones que sufre el virus durante el curso de la infección, se ha visto que, si persiste homología con las quasciespecies pretrasplante y no hay variación el grado de lesión histológica es mayor, y entre mayor grado de diversificación en la porción HVR1 de el VHC, menor lesión histológica.

2) Factores relacionados al donante: a) edad: recientemente ha sido comunicado, la asociación entre el sexo del receptor y la severidad de la recidiva, por datos de la UNOS, existiendo una interacción entre el sexo femenino, la infección del VHC y la evolución postrasplante  $p > .001$ (169)

b) La edad del donante, tiene influencia en la evolución del injerto, en los pacientes con hepatitis C. El uso de donantes mayores de 50 años, se ha

asociado a un tiempo medio de desarrollo de cirrosis de 2,7 años, en comparación a 10 años, si el donante es menor de 50 años (170).

3) Factores relacionados con la cirugía: Se ha asociado a mayor severidad de la recidiva, el tiempo de reperfusión prolongado (171).

4) Factores externos, como serían: a) la Inmunosupresión: el uso de nuevos y más potentes inmunosupresores en los últimos años y el uso de esteroides como complemento del inmunosupresor de base se han asociado a mayor severidad de la recidiva C, sobretodo, al sobreinmunosupresión que coexiste con estados de rechazo y necesidad de uso de bolos de metilprednisolona (58, 166, 167, 173).

b) el año del trasplante: la probabilidad acumulativa de desarrollar fibrosis aumentó de 0% de los pacientes trasplantados entre los años 1988-1989 a 18% en los pacientes trasplantados entre 1992-1993(157), esto tal vez podría explicarse, por el uso de donantes subóptimos en los últimos años, de mayor edad, y por el uso de más potentes inmunosupresores, inducción mayor e inmunosupresión de mantenimiento más intensa.

d) coinfecciones con otros virus como el del VIH , o el VHD, CMV, VHB (156) aumenta la severidad del daño histológico(156).

5) Factores relacionados al huésped: a ) HLA-B, el compartir el sistema de histocompatibilidad entre donante y receptor disminuye el riesgo de rechazo, pero promueve la recurrencia del VHC en el trasplante hepático(172).

Es importante señalar que la velocidad de progresión en los pacientes con trasplante hepático suele ser mucho más rápida que la de los pacientes

inmunocompetentes, de forma que se estima que los pacientes trasplantados tienen una probabilidad del 40% de volver a presentar cirrosis a los 5 años del trasplante (155). Otro tipo de lesión que puede aparecer en los pacientes con trasplante hepático y recidiva C es la hepatitis colestásica fibrosante, la cual ocurre en alrededor del 5% de pacientes con recidiva C post-trasplante y suele seguir un curso rápidamente progresivo (163,164). Tanto en los pacientes con trasplante hepático y recidiva C que acaban desarrollando cirrosis como los que desarrollan hepatitis colestásica fibrosante destaca un fenómeno: la formación acelerada de fibrosis en el injerto. Sin embargo, el mecanismo por el que se produce esta fibrosis acelerada no se conoce y los posibles factores patogénicos relacionados con la fibrogénesis, es decir, el proceso de formación y depósito de colágeno, con su proceso contrario, la colagenólisis, no ha sido investigado en este tipo de pacientes. Figura 5. implicado también el incremento de su estímulo y producción por los inmunosupresores. Estudios *in vitro* muestran que la CsA aumenta la expresión del TGF $\beta$  (95,96,124,125,126,127), se sabe también que el FK también estimula su producción(116,117,118,131,132,133), sin embargo posee una proteína enlazante la FKBP-12, ésta es un blanco de los receptores tipo 1 del TGF $\beta$ , (T $\beta$ r-1), por lo que al parecer disminuyen su acción, por lo que se pensaba por estudios hechos en trasplante renal que frenaba la producción de TGF $\beta$ .(119,120,121,122,123)

## Historia Natural de la Recidiva de Hepatitis C Postrasplante

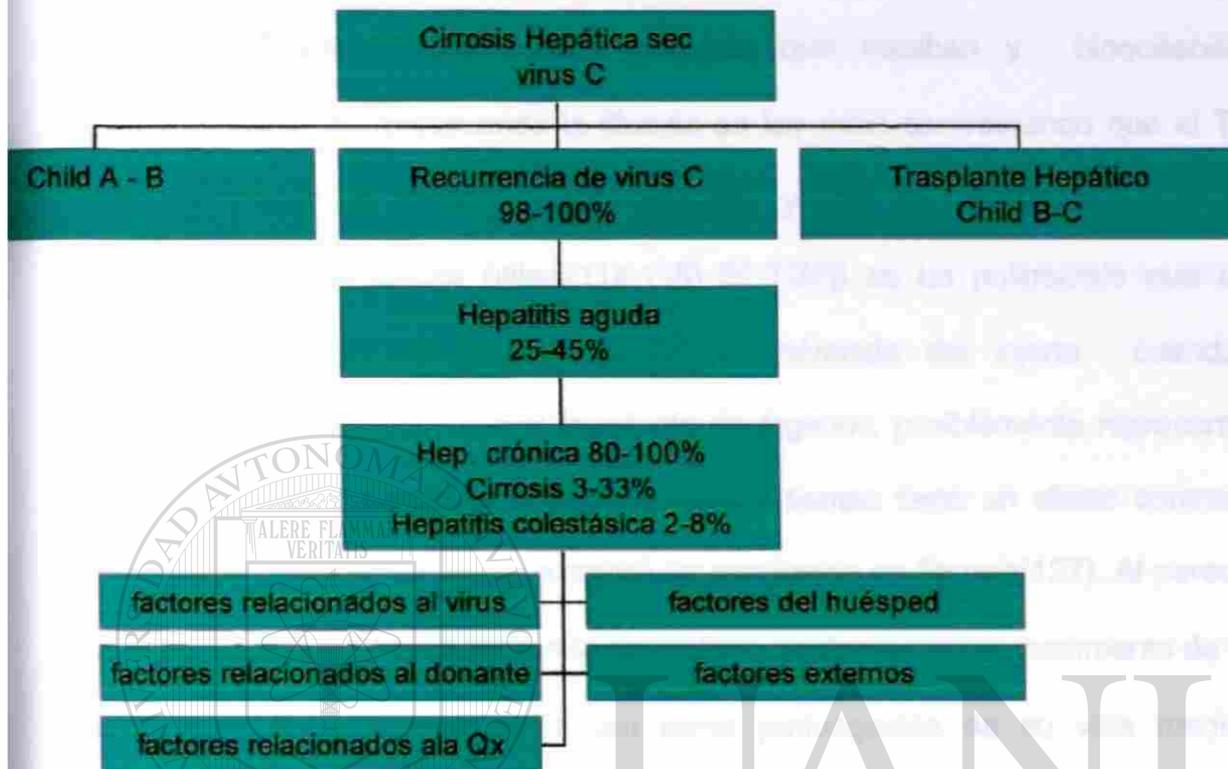


Figura 5. Historia natural de la recidiva del virus de hepatitis C postrasplante hepático

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 1.11.2 FACTOR TRASFORMANTE DE CRECIMIENTO BETA Y TRASPLANTE

#### HEPÁTICO.

Cómo se ha mencionado con anterioridad, el TGF $\beta$ , ésta implicado directamente en la fibrosis hepática, sabiendo de antemano, que la fibrosis hepática está acelerada en los pacientes con trasplante hepático y recidiva del virus C, se trató de establecer una correlación entre el TGF $\beta$  y la fibrosis acelerada del injerto

postrasplante, ya que diversos estudios han demostrado la mayor expresión del TGF $\beta$  en pacientes con fibrosis del injerto o rechazo crónico postrasplante renal y pulmonar(122,124,128,129); existen estudios que trataban y bloqueaban la expresión del TGF $\beta$  previniendo la fibrosis en las ratas corroborando que el TGF $\beta$  juega un papel en la fibrogénesis hepática y que su inhibición puede tener implicaciones terapéuticas útiles.(114,115) El TGF $\beta$  es un polipéptido que actúa como un inmunosupresor y prolonga la supervivencia del injerto cuando es administrada en conjunto con el trasplante de órganos, posiblemente represente un tipo de inmunosupresión endógena, al mismo tiempo tiene un efecto contrario al estimular el depósito de matriz extracelular resultando en fibrosis(127). Al parecer la ciclosporina incrementa la secreción de TGF $\beta$ 1, se demuestra el incremento de 2 a 4 veces más en el RNAmTGF $\beta$ 1, así como prolongación de su vida media en respuesta a ciclosporina (125,126).

La asociación entre el TGF $\beta$  y el rechazo agudo parece ser débil, aquí la citocina asociada es el TNF- $\alpha$  y no hay asociación entre la IL-10 o el polimorfismo del TGF $\beta$ , al parecer, el papel que jugaría el TGF $\beta$  sería promover el daño citotóxico mediado por células.(111,112) El papel del TGF $\beta$  en el rechazo(109-113,130) se ha implicado a dos niveles: en la fibrosis y en la aterosclerosis. En respuesta a estímulos inmunológicos como son: el daño causado por anticuerpos y en respuesta a mecanismos no inmunológicos como sería la lesión de isquemia de reperfusión la infección por citomegalovirus, la hipertensión, la hiperlipidemia y la hiperfiltración, hacen que exista daño endotelial y como consecuencia del daño endotelial, las células epiteliales producen una serie de factores de crecimiento

postrasplante, ya que diversos estudios han demostrado la mayor expresión del TGF $\beta$  en pacientes con fibrosis del injerto o rechazo crónico postrasplante renal y pulmonar(122,124,128,129); existen estudios que trataban y bloqueaban la expresión del TGF $\beta$  previniendo la fibrosis en las ratas corroborando que el TGF $\beta$  juega un papel en la fibrogénesis hepática y que su inhibición puede tener implicaciones terapéuticas útiles.(114,115) El TGF $\beta$  es un polipéptido que actúa como un inmunosupresor y prolonga la supervivencia del injerto cuando es administrada en conjunto con el trasplante de órganos, posiblemente represente un tipo de inmunosupresión endógena, al mismo tiempo tiene un efecto contrario al estimular el depósito de matriz extracelular resultando en fibrosis(127). Al parecer la ciclosporina incrementa la secreción de TGF $\beta$ 1, se demuestra el incremento de 2 a 4 veces más en el RNAmTGF $\beta$ 1, así como prolongación de su vida media en respuesta a ciclosporina (125,126).

La asociación entre el TGF $\beta$  y el rechazo agudo parece ser débil, aquí la citocina asociada es el TNF- $\alpha$  y no hay asociación entre la IL-10 o el polimorfismo del TGF $\beta$ , al parecer, el papel que jugaría el TGF $\beta$  sería promover el daño citotóxico mediado por células.(111,112) El papel del TGF $\beta$  en el rechazo(109-113,130) se ha implicado a dos niveles: en la fibrosis y en la aterosclerosis. En respuesta a estímulos inmunológicos como son: el daño causado por anticuerpos y en respuesta a mecanismos no inmunológicos como sería la lesión de isquemia de reperfusión la infección por citomegalovirus, la hipertensión, la hiperlipidemia y la hiperfiltración, hacen que exista daño endotelial y como consecuencia del daño endotelial, las células epiteliales producen una serie de factores de crecimiento

incluyendo el TGF $\beta$  en un intento de reparación del daño, esto promueve la fibrosis , así como la migración de células musculares a los vasos, dónde las células proliferan y provocan aterosclerosis y obliteración luminal (114, 115, 128, 129, 130).

En pacientes con trasplante renal que es dónde más se ha estudiado la expresión del TGF $\beta$ (124) , se ha demostrado que la expresión del TGF- $\beta$ b en forma latente en pacientes que estaban recibiendo Ciclosporina o en aquellos que recibían FK-506 no mostraba diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo la forma activa del TGF $\beta$ 1 se encontraba más incrementada en las biopsias de los pacientes que estaban bajo tratamiento con Ciclosporina que aquellos que tomaban Tacrolimus (FK-506)(124). Hasta el momento se ha visto que ambos inmunosupresores estimulan la producción de TGF $\beta$  , sin embargo el Tacrolimus posee una enzima enlazante del receptor TGF $\beta$ 1 que es la FKBP12, pudiendo ser una vía por la cual controla los efectos deletéreos del TGF $\beta$  (119-123). Aunque existen otros estudios que demuestran que ambos inmunosupresores tanto la ciclosporina como el Tacrolimus inducen hiperexpresión de TGF $\beta$  (89). En pacientes con trasplante renal, se han estudiado la influencia de los inmunosupresores con determinaciones sanguíneas de TGF $\beta$ , aunque se sabe que éste se incrementa en situaciones diversas y que la determinación sanguínea es totalmente inespecífica, ellos notaron que la monoterapia con CsA, mostraba niveles mayores de TGF $\beta$ , que la terapéutica dónde incluía prednisona , y especialmente aquella terapéutica que no incluía ningún inhibidor de la calcineurina , ni ciclosporina ni tacrolimus , uno que se basaba en AZA,

micofenolato Mofetil y prednisona.(131) Se ha visto que el momento en que se realizó el trasplante tiene influencia sobre el grado de recidiva C postrasplante y esto se ha asociado al uso de nuevos y más potentes inmunosupresores, en los últimos años , que provocan mayor severidad de la recidiva C. Este posible efecto regulador de los inmunosupresores sobre el TGF $\beta$  no había sido investigado en el trasplante hepático.

### **1.11 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Teniendo en cuenta que los pacientes trasplantados con recidiva del VHC postrasplante, el grado de fibrosis es mayor, pudiendo desarrollar cirrosis en un periodo de tiempo corto; y conociendo de antemano la relación que tiene el TGF $\beta$  con el desarrollo de fibrosis hepática se planteo el problema de si seria el TGF $\beta$  uno de los factores involucrados en la fibrosis acelerada del injerto en los pacientes sometidos a trasplante hepático con recidiva C postrasplante.

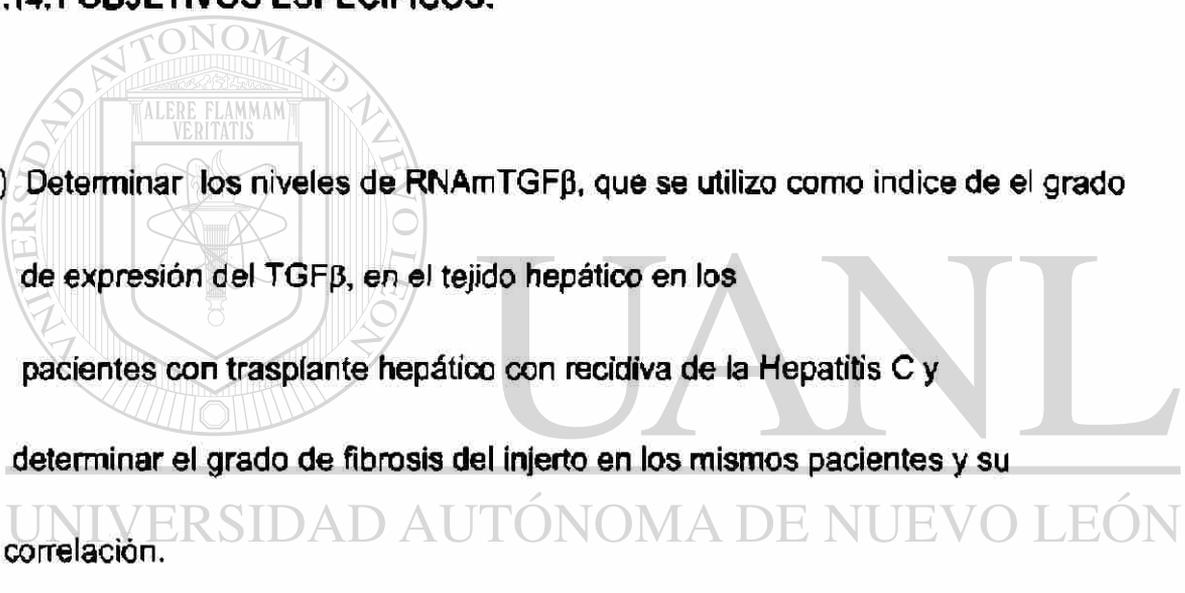
### **1.12 JUSTIFICACIÓN:**

Debido a que en el paciente postrasplantado con recidiva de virus C, el grado de fibrosis es mayor en un periodo de tiempo más breve. Necesitamos una herramienta que pronostique el grado de fibrosis en éste tipo de pacientes. Asi mismo el conocer el grado de influencia de los inmunosupresores sobre el proceso de fibrosis nos será útil para indicar la mejor alternativa de los mismos.

### 1.13 OBJETIVO GENERAL:

Investigar la *correlación de la expresión del TGF $\beta$  y el grado de fibrosis en la recidiva del virus de la hepatitis C postrasplante.*

#### 1.14.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 
- a) *Determinar los niveles de RNAmTGF $\beta$ , que se utilizo como indice de el grado de expresión del TGF $\beta$ , en el tejido hepático en los pacientes con trasplante hepático con recidiva de la Hepatitis C y determinar el grado de fibrosis del injerto en los mismos pacientes y su correlación.*
- b) *Determinar si el tipo de fármaco inmunosupresor fundamental (Ciclosporina o Tacrolimus) y su dosis acumulativa determinan los niveles de RNAmTGF $\beta$  en estos pacientes.*

### 1.14.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- a) Comparar el valor del RNAmTGF $\beta$  de pacientes postrasplantados con recidiva C entre los diferentes grupos de estudio.
- b) Determinar el índice de progresión de fibrosis, mediante el aumento semicuantitativo anual de la fibrosis desde el trasplante.

### 1.15 HIPOTESIS:

a) Hipótesis nula 1: No existe correlación entre el grado de fibrosis y los niveles de RNAmTGF $\beta$  en la recidiva C postrasplante.

b) Hipótesis alterna 1: Existe una correlación entre el grado de fibrosis y los niveles de RNAmTGF $\beta$  en la recidiva C postrasplante.

c) Hipótesis nula 2: El tipo de inmunosupresor usado en el trasplante hepático no influye en la expresión del RNAmTGF $\beta$ .

d) Hipótesis alterna 2: el tipo de inmunosupresor usado influye en la expresión del RNAmTGF $\beta$  : Ciclosporina estimulándolo y Tacrolimus disminuyéndolo.

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1 EQUIPO

Politrón Tissue tearor TM, modelo 985370, velocidad variable

BIOSPEC PRODUCTS INC.

Ultracentrifuga L-60 Beckamn con buckets y con rotor SW55T1

Espectrofotómetro Beckman DU 640.

Termociclador Automático PTC-100 MJ Research, Inc.

Sistema de Imágenes para documentación de los geles UV-Visible

Imagener

Microcentrifuga Beckman,microfuge E

Micropipetas pasteur

Tubos de eppendorf (standard microtest tube 3810x)

Tubos de nunc

Papel whatman

Sistema de Imágenes y Documentación de geles: UV-Visible Imagener

for Electrophoresis, procesador Pentium, Video Cámara lentes 6-48

mm zoom

Trasiluminador de luz dual 302nm y luz ultravioleta.

Cuarto oscuro

Programa universal Bio 1D para cuantificar, identificar y comparar

DNA de la Asociación Americana de Biotecnología

Programas : SPSS versión 10 para análisis estadísticos

Microsoft Word version: Microsoft Office 2000

Power Point version :Microsoft Office XP

## 2.2 REACTIVOS Y SOLVENTES:

Beta -Mercaptoetanol (ME) ( Merck)

Launilsarcosilsódico (N-lauroylsarcosina) (Sigma)

Cloruro de Cesio (CsCl) (Sigma Chemicals)

Dietilpirocarbonato ( DEPC ) (Ambion)

Guanidintioscianato (GTC)(Ambion)

RNA ase ZAP TM (Sigma Chemical)

Acetato Sódico(AcNa)(Ambion)

Etanol 70%

Etanol absoluto frío (-20|°) (Merck)

Bromuro de Etidio (Invitrogen, TM)

DNAsa (kit DNA-free: Laboratorios Ambion )

1st Strand cDNA síntesis kit for RT-PCR (AMV) : Roche Diagnostic Corp

Nitrógeno Líquido – 180° (Air Liquid)

## **2.3 MATERIAL BIOLÓGICO**

### **2.3.1 Biopsia Hepática de pacientes trasplantados con recidiva del virus C**

Se utilizaron las biopsias de 49 pacientes con trasplante hepático y recidiva C ingresados a la sala de Trasplante Hepático en el Hospital Clinic de Barcelona en el periodo comprendido de agosto de 2000 a agosto de 2001 que reunieran los criterios de inclusión e excluyeron 2 pacientes que en el estudio anatomopatológico se encontró rechazo crónico y un paciente que durante la evolución de su trasplante negativizó espontáneamente el virus C. Quedando un total de 46 pacientes trasplantados.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



### **2.3.2 Biopsia Hepática de pacientes no trasplantados**

Se utilizaron las biopsias de 35 pacientes con hepatitis crónica C 17 pacientes , y con cirrosis hepática de etiología C 18 pacientes, que estaban siendo vistos en la consulta externa de hepatología en el periodo comprendido de agosto 2000 a agosto del 2001.

### **2.3.3 Biopsia Hepática de pacientes controles.**

Ante la imposibilidad de llevar a cabo biopsias hepáticas en pacientes controles en 17 pacientes, se obtuvieron muestras de pacientes sometidos a laparotomía exploradora para resección de metástasis hepáticas, solo cuando reunieran los siguientes requisitos: que el paciente tuviera menos de dos metástasis hepáticas y que la biopsia fuera tomada de un sitio distal a la lesión metastásica, siendo enviada posteriormente la biopsia a valoración anatomopatológica y corroborándose la normalidad de la misma. Estas biopsias se tomaron en el periodo comprendido de agosto de 2000 agosto de 2001.

## **2.4 METODOS**

### **2.4.1 Diseño del Estudio**

Estudio Observacional Analítico, Transversal Comparativo, Prospectivo  
muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

### **2.4.2 Criterios de Inclusión**

- 1) Pacientes postrasplantados con RNA VHC PCR (+)
- 2) Pacientes con Trasplante Hepático por virus C, sin distinción de sexo y edad con 6 meses o más del trasplante que deban ser sometidos a punción biopsia hepática por elevación enzimática.

- 3) Todo paciente postrasplantado por virus C, al cumplir un año del Trasplante Hepático con biopsia de control protocolaria

#### **2.4.4 Criterios de Exclusión**

- 1) Aquellos pacientes que fueron postrasplantados por otra etiología de la cirrosis hepática (virus B, alcohol, CBP, CEP)
- 2) Pacientes trasplantados por cirrosis hepática por virus C que son sometidos a PBH dentro de los primeros 6 meses postrasplante, por alteraciones enzimáticas, ya que durante los primeros meses postrasplante las posibilidades de que se deban a un rechazo agudo son mayores.

#### **2.4.5 Criterios de Eliminación**

- 1) Aquellos pacientes que en la evaluación de la biopsia hepática presentaban además de la recidiva C rechazo agudo o crónico.
- 2) Pacientes postrasplantados con recidiva del virus C que durante la evolución de su trasplante negativizaron espontáneamente el virus C.

#### **2.4.6 Cálculo del Tamaño de la Muestra**

.Población Infinita

.Inferencia realizada : Prueba de Hipótesis

.Parámetro estimado: Una diferencia de proporciones.

**Prueba de Hipótesis** : Diferencia de proporciones de dos poblaciones o de una proporción de referencia

$Z\alpha = 1.96$  Nivel de significancia (IC al 95%)

$Q1 = 0.5$

$Z\beta = 1.2$  Potencia del 80%

$P2 = 0.10$

$P1 = 0.5$

$Q2 = 0.90$

$$n = \frac{(z\alpha + z\beta)^2 (P1Q1 + P2Q2)}{(P1 - P2)^2} = 17 \text{ pacientes}$$

**Figura 6. Fórmula para calcular el tamaño de la muestra.**

Se incluirán 17 pacientes para cada grupo de estudio, con un mínimo de 63 pacientes en total.

## 2.5 Muestras

Las muestras de tejido hepático se obtuvieron mediante biopsia percutánea dirigida por ecografía, fueron realizadas en el departamento de radiodiagnóstico, usando aguja de TruCut en el grupo de pacientes trasplantados y en el grupo de

los no trasplantados que incluía aquellos pacientes con hepatitis crónica tipo C y los pacientes con cirrosis hepática de etiología C.

Las muestras de tejido hepático de los pacientes controles, se obtuvieron mediante biopsia en cuña, o biopsia con aguja de trucut en quirófano, una vez que se obtuvo el tejido hepático el 75% se destinó para estudio anatomopatológico y el 25% se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido a  $-180^{\circ}$  y se conservó en un tanque de nitrógeno hasta el momento de la extracción del RNA.

### 2.5.1 Extracción del RNA

La extracción del RNA total a partir de la biopsia hepática (174,177), se realizó por lisis del tejido hepático con un politrón (Rotor Beckman TST 55.5) en tiosocianato de guanidina 4 M, que contenía 1.5% de beta-mercaptoetanol y 0.5% de Laurilsarcosilsódico. Posteriormente se hizo un gradiente de cloruro de cesio (5.7M) adecuado para la precipitación de RNA por ultracentrifugación. Este método es una modificación del método de Cox (1963) que proporciona una mayor cantidad y con máxima pureza del RNA (175). En ésta solución el RNA es mucho más denso, que los otros componentes celulares, quedando durante la ultracentrifugación en la parte superior del gradiente los restos de membrana y proteínas, y en el centro del gradiente la hebra de DNA, se descarta el sobrenadante, con pipeta pasteur por capas, secar con papel whatman. El RNA obtenido se resuspendió en 300 microlitros de agua de DEPC. La ultracentrifugación se llevó a cabo en una ultracentrífuga L-60 de Beckman con un rotor SW55Ti a 38,000 rpm durante 18 hrs a  $20^{\circ}$ .

Todo el material utilizado que iba a tener contacto con el tejido, como son frascos, pipetas, pinzas y espátula fueron esterilizados y se les aplicó una solución RNAsa ZAP TM para evitar la destrucción del RNA. Los pasos para la extracción del RNA ejemplificados en Figura 7.

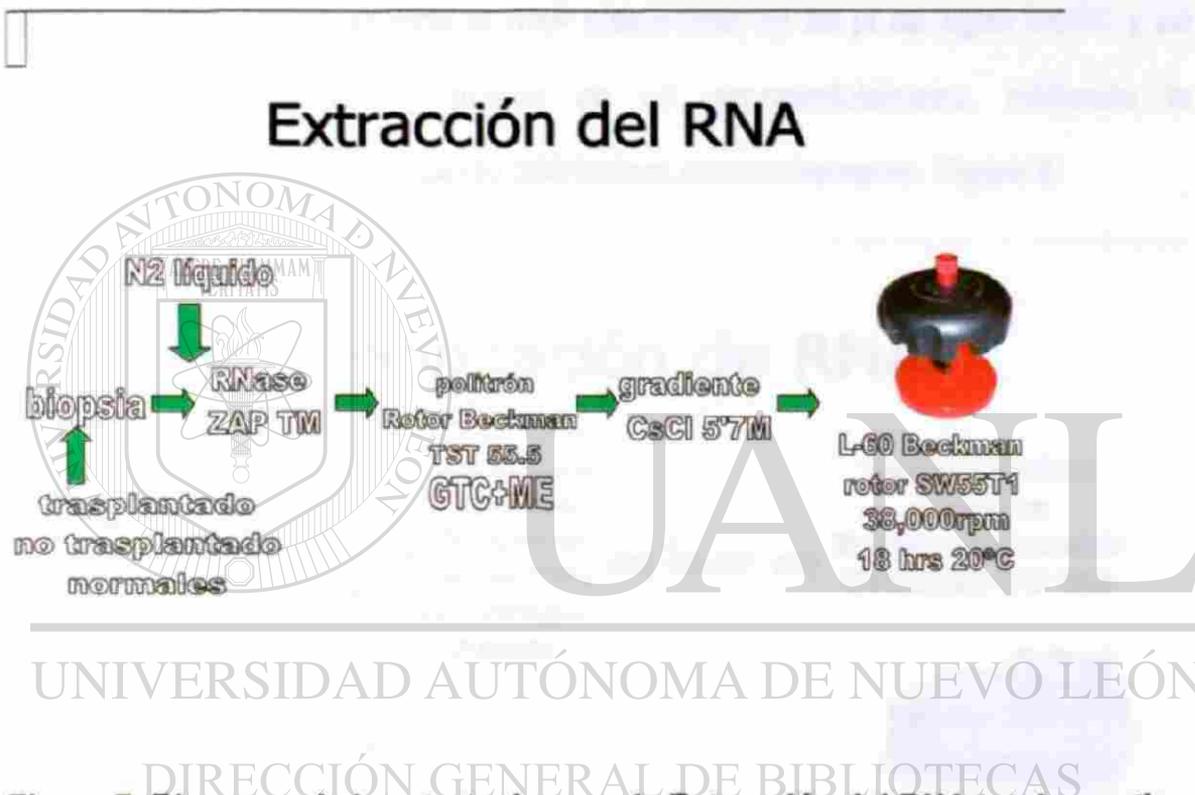


Figura 7. Diagrama de la estrategia para la Extracción del RNA total a partir de tejido hepático

### 2.5.2 Precipitación del RNA

El RNA obtenido se precipitó añadiendo al tubo de eppendorf que contenía el RNA resuspendido en aguda DEPC 1/10 del volumen de acetato sódico 3M PH6 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se deja toda la noche a  $-80^{\circ}$ . Al día

siguiente se centrifugó a 14,000 rpm ,4°, durante 1 hora y se descarta el sobrenadante. El RNA precipitado se lavó con 400µl de etanol a 70%, volviéndose a centrifugar a 14,000rpm, 4°, por 30 minutos, volviéndose a descartar el sobrenadante. Se deja secar el RNA precipitado a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta asegurarnos que no quedan restos de etanol.

Posteriormente se resuspende el RNA precipitado en 20 µl de agua DEPC y se valoró la concentración y pureza en un espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a 260nm y el cociente 260/280nm respectivamente. Figura 8.



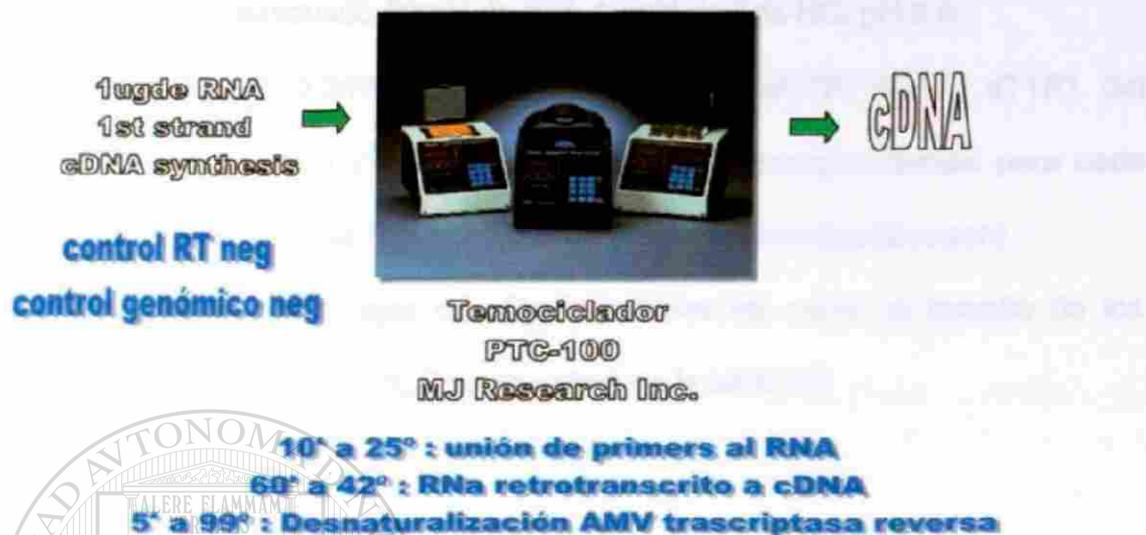
**Figura 8. Estrategia para la precipitación del RNA y medición de su concentración y pureza por espectrofotometría**

### 2.5.3 RT-PCR

La determinación de los niveles de mRNA del TGF $\beta$  se realizó mediante la técnica de la RT-PCR (176). Se partió de 1  $\mu$ g de RNA y se realizó la retrotranscripción a cDNA usando el kit "1st strand cDNA síntesis" (Roche Diagnostics Corp.), mediante el cual la enzima AMV Transcriptasa Reversa sintetiza una cadena de cDNA mediante la elongación de unos hexarucleótidos ("iniciadores"), que se unen al azar a la cadena molde de RNA todo ello en un buffer de reacción adecuado (100mM Tris, 500mM KCL; PH 8.3), 1mM de dNTPs, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 50U de Inhibidor de RNAasa).

Las condiciones de reacción fueron: 10 min a 25° donde los primeros hexámeros se unen al RNA; 60 min a 42° donde el RNA es retrotranscrito a cDNA y 5 min a 99° donde la AMV Transcriptasa Reversa es desnaturalizada para impedir subsiguientes interferencias. El producto de reacción se guarda a -20° Figura 9.

## RT-PCR



**Figura 9. Determinación de los niveles de RNAmTGF $\beta$  por medio de la Reacción de Transcriptasa Reversa (RT-PCR)**

En cada reacción de RT-PCR se introdujeron dos tipos de controles de retroamplificación:

-Un control RT negativo, que no es más que un control de contaminación externa de los reactivos de la RT-PCR, que contiene el mismo buffer de reacción que las muestras pero donde el RNA se ha sustituido por agua DEPC.

-Un control Genómico negativo, que sirve para controlar la presencia de DNA genómico en la muestra, y en el que se adicionan todos los reactivos menos la MLV TRANscriptasa reversa. .

Estos controles se llevan durante los pasos siguientes y se comprueban junto con las muestras en gel de agarosa.

### 2.5.4 PCR

La reacción de PCR se realizó con 4µl del cDNA en un volumen total de 50 µl que contenía un buffer adecuado 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 9.0,

1% de tritón X-100, 0.2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), del iniciador "sentido" 0.2 mm y 0.2mm del "antisentido" correspondientes para cada reacción de PCR 1.5mM de MgCl, y 2.5 U de la Taq polimerasa (Ecogen)

Las secuencias de las parejas de oligonucleótidos así como el tamaño de los fragmentos amplificados por PCR se muestran en la tabla VII:

**Tabla VII. Secuencias de parejas de oligonucleótidos y tamaño de los fragmentos amplificados por PCR**

Gen	Secuencia	Producto amplificado (pb)
TGFβ	5'-gccctggacaccaactattgc-3' 5'-tcagctgcactgcaggagc-3'	338
GADPH	5'-accacagtccatgccatcac-3' 5'-tccaccaccctgttgctga-3'	453

Las reacciones de PCR se hicieron en un termociclador automático (PTC-100 MJ Research, Inc) y las condiciones de reacción fueron las siguientes:

- 1.-Desnaturalización: 1min a 96°
- 2.-Hibridación de los iniciadores específicos: 1min a 60° para TGF $\beta$  y GAPDH.
- 3.- Elongación de la cadena (30 ciclos para GAPDH y TGF $\beta$ ) : 1min a 72°
4. Extensión final: 5min a 72°.

Se tomaron en cuenta éstas condiciones, ajustando los ciclos cuando inició la detección de los productos amplificados. Figura 10.

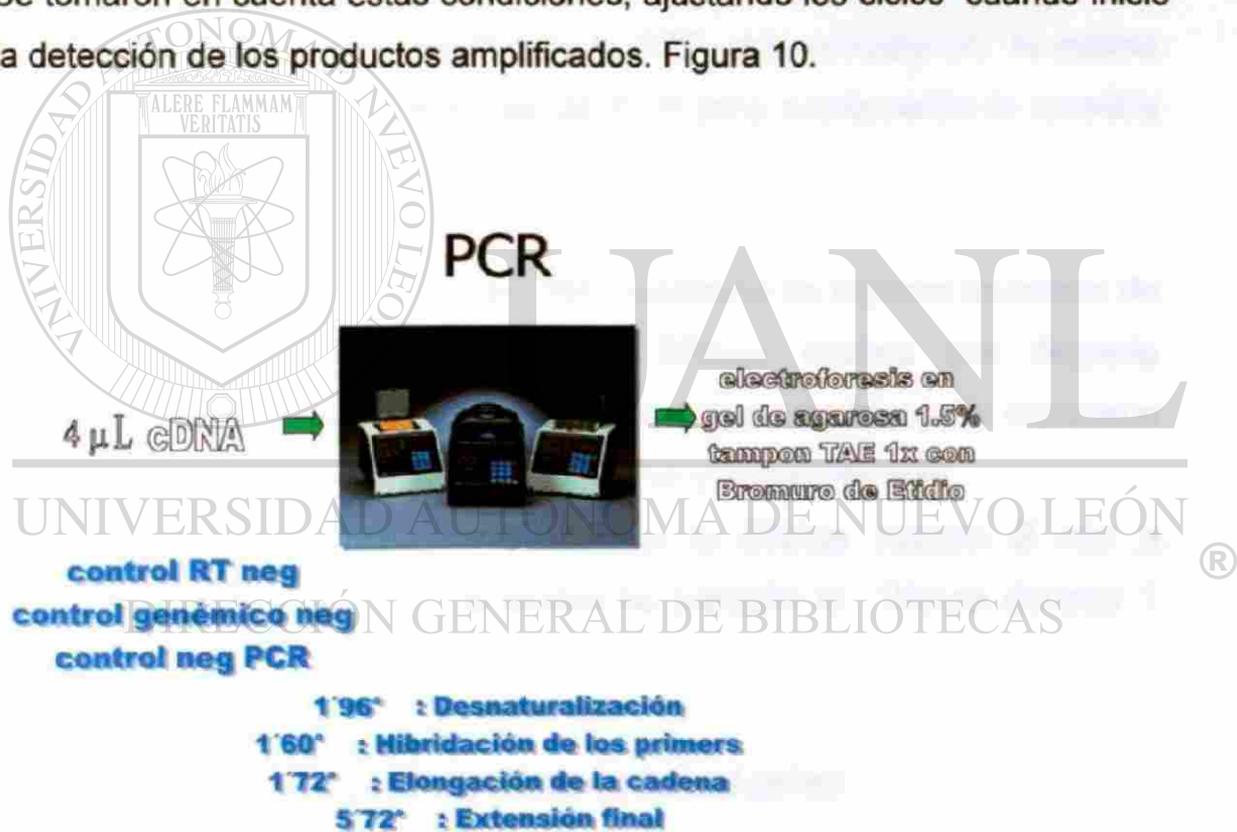


Figura 10. Diagrama de la estrategia para la obtención de DNA de doble cadena por PCR.

Los productos de PCR se analizaron en mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE 1x (400mM de Tris-Acetato y 10mM de EDTA pH 8.3) con Bromuro de Etidio a concentración 0.5 microgramos/ml), intercalador del DNA con fluorescencia en la luz ultravioleta. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría (PCR Semicuantativa, 178). Se tomó la cifra obtenida del TGF $\beta$  y del GADPH (control interno) y posteriormente se realizó una sustracción, obteniéndose un cociente, que es el resultado, anotado para cada una de las muestras.

En la reacción de PCR también se procesa, junto con los dos controles de RT anteriores, un control negativo de la PCR, que consiste en la misma reacción para los propios reactivos de PCR pero sustituyendo la muestra (cDNA) por agua estéril.

Para eliminar la contaminación de DNA genómico de algunas muestras de RNA se procedió al tratamiento con DNAsa, enzima que degrada selectivamente el DNA, utilizando el kit "DNA-free" (Ambion): Se incubaron las muestras con DNAsa a 37° durante 30min y posteriormente se adicionó un reactivo inactivador de la DNAsa durante 2 min a Temperatura ambiente, tras los cuales se precipitó la DNAsa durante 1 minuto a 10000g.

### **2.5.5 Documentación del Gel y Sistema de Imágenes**

La documentación del gel se realizó en cuarto oscuro por medio de fluorescencia con luz ultravioleta, se fotografió y posteriormente se midió la intensidad de las bandas, por medio de densitometría a través de un sistema informático universal

BIO ID de la Asociación Americana de Biotecnología que permite la medición semicuantitativa de los productos obtenidos por PCR.

## Documentación del gel y sistema de imágenes



**Figura 11. Documentación del gel y sistema de imágenes**

### 2.6 Tipos de Variables

Para nuestra primera hipótesis, en la que se buscaba la correlación entre el grado de fibrosis y los niveles del RNA $\alpha$ TGF $\beta$ , actuaron como variable Independiente el RNA $\alpha$ TGF $\beta$  (causa) y como variable dependiente el grado de fibrosis o estadio en la biopsia hepática (efecto). Las variables confusoras fueron: la dosis acumulada de esteroides, el uso de sobreinmunosupresión al usar bolos de metilprednisolona , la carga viral y el genotipo del virus, así como las variables demográficas que serían : sexo y edad tanto en el donante como en el receptor y el tiempo de evolución desde el trasplante esto se ejemplifica en la figura 12.

## TIPOS DE VARIABLES

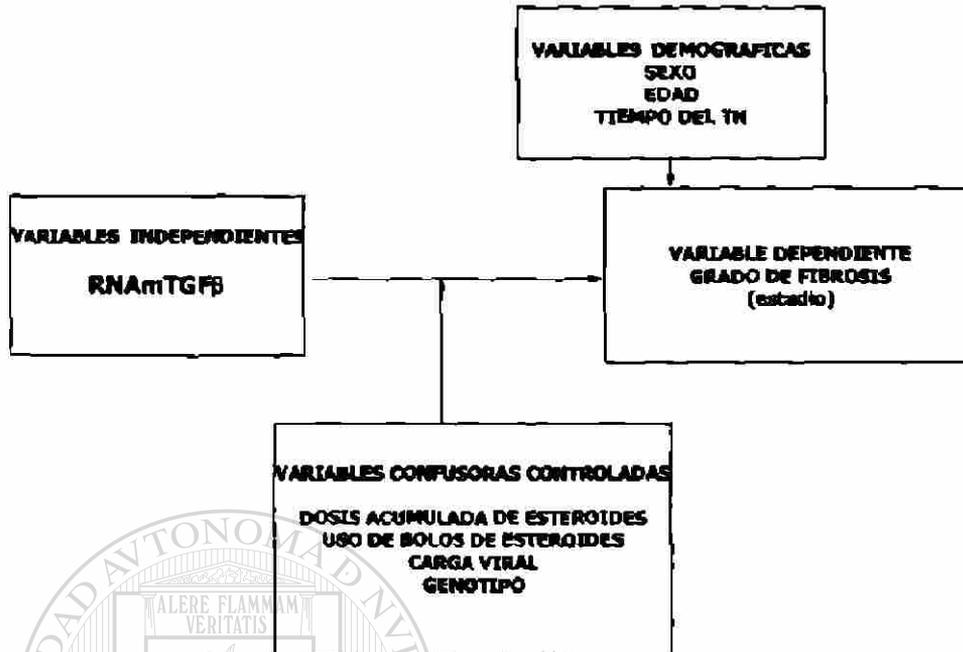
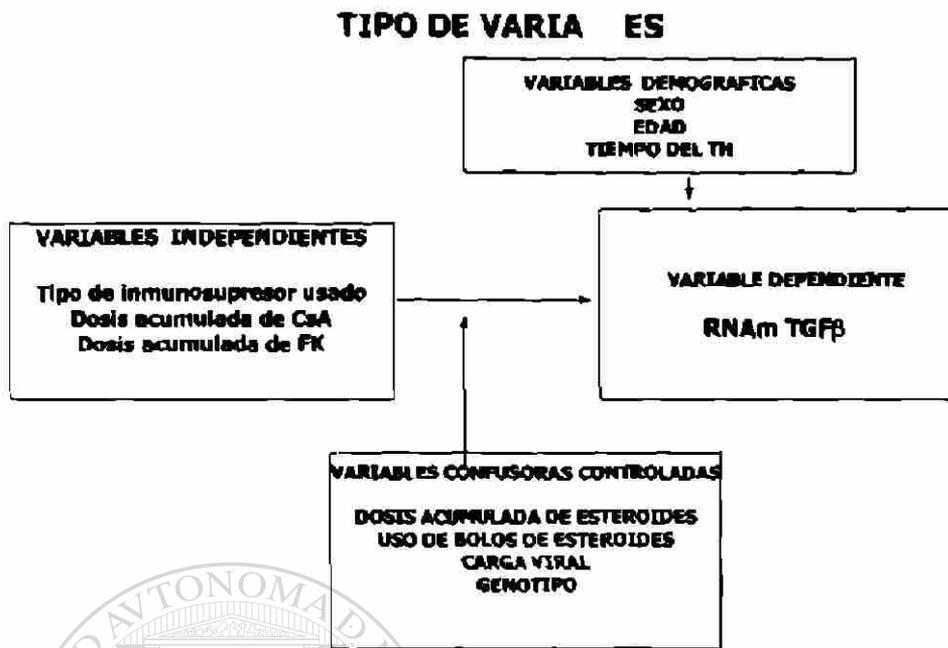


Figura 12. Tipos de variables (a)

En nuestra segunda hipótesis en la que se quería demostrar si el tipo de inmunosupresor influye en la expresión del RNAmTGFβ, actuaron como variable independiente (causa) el tipo de inmunosupresor usado, así como las dosis acumuladas del inmunosupresor: ya fuera Ciclosporina o Tacrolimus y como variable dependiente: el RNAmTGFβ (efecto) actuando como variables confusoras también el genotipo, a carga viral y las dosis acumuladas de esteroides y como variables demográficas, el sexo y la edad del donante y el receptor y el tiempo desde la realización del trasplante figura 13.



**Figura 13. Tipo de variables (b)**

## 2.7 Análisis Estadístico

Consistió en la comparación de los diferentes grupos de estudio de acuerdo a los siguientes parámetros:

- a) Grado de fibrosis en la biopsia hepática estimado mediante su estadio.(179) y mediante su aumento semicuantitativo anual desde el trasplante (181)
- b) Producción de TGFβ estimado mediante el RNAm de éste factor.
- c) Analizar el efecto del tipo de inmunosupresor usado sobre el RNAmTGFβ

Estas comparaciones se realizaron mediante el **Coefficiente de Correlación**.

Comparación de dos medias mediante la t de Student para variables continuas o discretas, y el Análisis de Variancia para la comparación entre de varias medias.

Correlación entre variables cuantitativas distintas que se realizó mediante el análisis de regresión de Spearman

$\chi^2$  para variables dicotómicas

Los parámetros para cada factor estudiado fueron: media y desviación estándar. Se empleó el Sistema estadístico SPSS versión 10.0 para el procesamiento de datos.

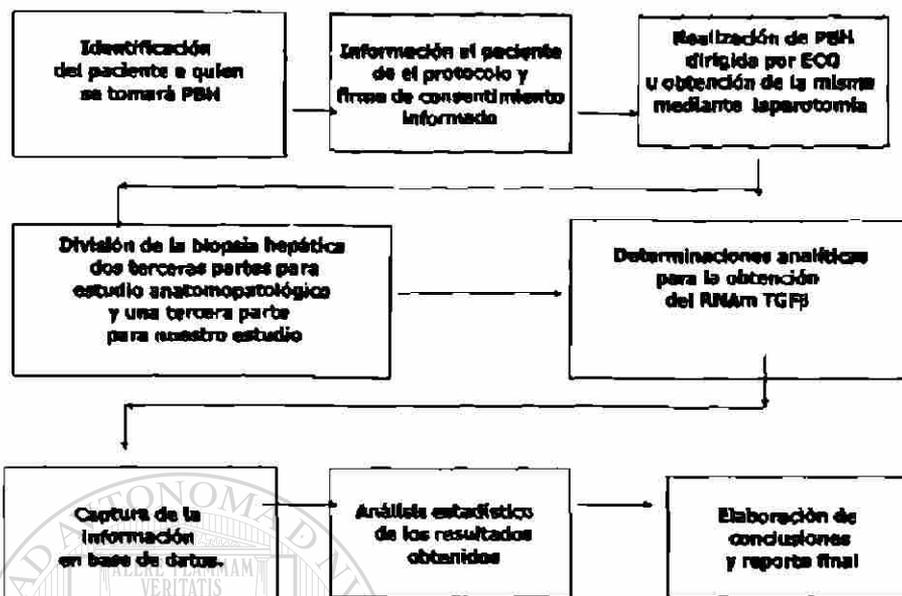
## **2.8 Aspectos Éticos**

Se siguieron los lineamientos de Helsinki (apéndice A) sobre protocolos de investigación en humanos, solicitándoseles a cada paciente autorización por escrito para obtener el consentimiento informado (apéndice B) para su participación de manera voluntaria en el estudio.

## **2.9 Flujograma de actividades**

Se seleccionaron los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión, a los cuales se les realizó PBH dirigida por ECO o mediante laparotomía exploradora, previa información y firma de consentimiento informado. Se realizaron los procedimientos para la obtención del RNA $\alpha$ TGF $\beta$ . Posteriormente se capturó la información, se realizaron los análisis estadísticos y se elaboró el presente reporte. (figura13)

## FLUJOGRAMA



**Figura 13. Flujo de Actividades**

## CAPITULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Constitución de los Grupos de Estudio

Se estudiaron un total de 98 pacientes, 46 pacientes trasplantados por cirrosis hepática secundaria a virus C y con recidiva del virus C postrasplante (47%), 35 pacientes no trasplantados (36%), dentro de los cuales 18 pacientes son cirróticos con virus C positivo (51%) y 17 pacientes portadores de hepatitis crónica por virus C (49%), así mismo se incluyó un grupo de controles correspondientes a 17 pacientes. Debido a la dificultad de conseguir biopsias hepáticas de pacientes normales, se incluyeron aquellos pacientes que eran sometidos a laparotomía exploradora para la escisión de tumores hepáticos metastáticos, la mayoría provenientes de carcinoma de colon que tuvieron como máximo dos lesiones metastásicas menores de 5 cms. La biopsia hepática se tomó en forma de cuña de un sitio distal a la zona metastásica y se corroboró por anatomopatología que el tejido hepático era normal.

#### 3.2 Variables Demográficas

De acuerdo a las variables demográficas: existió predominio del sexo masculino sobre el femenino; en el grupo de trasplantados la población estuvo constituida por 31 hombres (67%) y 15 mujeres (33%), en el grupo no trasplantado provenientes

del sexo masculino fueron 21 hombres y 14 mujeres, y en los controles normales: 10 del sexo masculino (59%) y 7 del sexo femenino (41%)

En cuanto a la edad observamos : la media en el grupo de trasplantados :58 años(50-65), en el grupo no trasplantado la media es de 50 años (38-62) y en el grupo control la media fue de 63 años (49-77), por análisis de variancia encontramos  $F = 10.149$   $p = <.000$  significativa de la variabilidad intergrupos, siendo el grupo de mayor edad el correspondiente a los controles normales, lo cual es un hecho ya que los pacientes portadores de lesiones metastásicas hepáticas son los de mayor edad.

### 3.3 Rechazo

En el grupo de trasplantados habían sufrido de rechazo agudo 21 pacientes (46%) requiriendo de aumento en la inmunosupresión para el tratamiento del rechazo agudo correspondiendo a 3 bolos de 1 gr de metilprednisolona y 25 pacientes (54%) no sufrieron de rechazo durante la evolución de su trasplante.

### 3.4 Carga Viral

La carga viral en los pacientes trasplantados tuvo una media de: 1;760,534 UI/mL  $\pm$ 1;6623,847 UI/mL , y la media de la carga viral en los no trasplantados fue de 688,078  $\pm$  559,613 UI/mL ,siendo mayor en el grupo de pacientes trasplantados .Al comparar ambas medias mediante una T de Student

encontramos que la carga viral de los pacientes trasplantados es prácticamente el doble que la de pacientes no trasplantados siendo significativa la diferencia entre ambos grupos. ( $t=3.17$   $p= < .002$ ).

**Tabla VIII. Características de los diferentes grupos de pacientes**

		Trasplantados n = 46 ( 47%)	No-trasplantados n = 35 (36%)	Controles n= 17 (17%)	Pruebas Estadísticas p
Sexo	M	31 (67%)	21 (65%)	10 (59%)	
	F	15 (33%)	14 (40%)	7 (41%)	
Edad		58 (50-65)	50(38-62)	63(49-77)	* 10.149 <.000
Rechazo	Si	21 (46%)	NA	NA	
	No	25 (54%)			
Bolus de MPD	Si	21(46%)			
	No	25(54%)			
Carga Viral		1;760,534 $\pm$ 1;623,847	688,078 $\pm$ 599,613	NA	** 3.17 <.002

NA= no aplica MPD= metilprednisolona \* ANOVA \*\* t de student

### 3.5 Genotipos Virales

El genotipo muestra un predominio 1b en ambas poblaciones, presentándose en el grupo de trasplantados en un 81% de los casos en un total de 37 pacientes, genotipo 1a en 2 pacientes(4%) , genotipo 4 en 2 pacientes (4%) y en 1 paciente

genotipo 3 (2%) de los casos, en el grupo de no trasplantados tenemos que el genotipo 1 se presentó en 46% de los casos 16 pacientes, seguido por el genotipo 1a en 6 pacientes (17%) genotipo 3 en 3 pacientes (9%) y genotipo 2 en 2 pacientes 6%, con 8 pacientes en los que el genotipo no fue realizado (22% de los casos).

**Tabla IX .Genotipos virales encontrados.**

	Trasplantados n = 46	No – Trasplantados n = 35
Genotipo Identificado (n)	42	27
1 a	2 ( 4%)	6 (17%)
1 b	37(81%)	16(46%)
1a+ 1 b	39 (85%)	22(63%)
2	0 ( 0%)	2 ( 6%)
3	1 ( 2%)	3 ( 9%)
4	2 ( 4%)	0 ( 0%)
Genotipo no Identificado	4 ( 9%)	8 (22%)

### 3.6 Exámenes de Laboratorio

Los exámenes de laboratorio se tomaron el día anterior a la biopsia hepática y se describen en la tabla X.

TABLA X. Exámenes de laboratorio en los tres grupos de pacientes.

Prueba	Trasplantados $\bar{x} \pm 1 \text{ DE}$	No trasplantados $\bar{x} \pm 1 \text{ DE}$	Controles $\bar{x} \pm 1 \text{ DE}$	Prueba estadística * p
Hb 12-17(g/L)	13.4 $\pm$ 1.7	13.4 $\pm$ 2.1	12.7 $\pm$ 1.8	
Hto 36-51(%)	39.1 $\pm$ 5.0	39.5 $\pm$ 6.3	38.5 $\pm$ 4.7	
Leucocitos ( K/uL)	4.9 $\pm$ 1.8	5.6 $\pm$ 2.5	5.8 $\pm$ 2.6	
Plaquetas 40-400( K/uL)	134.5 $\pm$ 55	142.6 $\pm$ 87.7	213.3 $\pm$ 107.6	6.320 .003
T de Protombina (%)	88.3 $\pm$ 13.8	79.4 $\pm$ 21.6	92.7 $\pm$ 12.4	4.335 .016
Segmentados 45-75(%)	62.1 $\pm$ 9.8	61.6 $\pm$ 12.1	70.3 $\pm$ 14.5	
Albúmina 37-53 (g/L)	42.5 $\pm$ 4.2	38.2 $\pm$ 6.6	41.7 $\pm$ 3.6	
Proteínas 60-80(g/L)	71 $\pm$ 7.3	70.5 $\pm$ 6.4	69.8 $\pm$ 6.5	
AST 10-40 (UI/L)	80.7 $\pm$ 65.5	71.9 $\pm$ 45.3	25.9 $\pm$ 7.5	4.509 .014
ALT 10-40 (UI/L)	98.3 $\pm$ 82.6	92.2 $\pm$ 77.2	26.5 $\pm$ 9.2	4.834 0.10
FA 90-290(UI/L)	252.3 $\pm$ 93	156.9 $\pm$ 39.2	156.9 $\pm$ 39.2	3.408 0.037
GGT 5-40 (UI/L)	145.2 $\pm$ 20.8	25.9 $\pm$ 19.5	25.9 $\pm$ 19.5	4.460 0.014
BT .2-1 (mg/dL)	1.41 $\pm$ 1.2	.73 $\pm$ .48	.73 $\pm$ .48	
Creatinina (mg/dL)	1.2 $\pm$ .23	.96 $\pm$ .21	1 $\pm$ .3	
BUN 10-25	28.2 $\pm$ 8.2	19 $\pm$ 9.1	17.6 $\pm$ 1.2	11.399 .000
Colesterol (mg/dL)	183.8 $\pm$ 52.5	171 $\pm$ 54.5	200.2 $\pm$ 67.2	
Triglicéridos(mg/dL)	129.6 $\pm$ 90.4	91.5 $\pm$ 50.3	110.7 $\pm$ 47.3	

\* ANOVA

De acuerdo a los parámetros de laboratorio, se realizó un análisis de varianza para ver si existía diferencia intergrupos y se encontró diferencia significativa en varios parámetros, una vez que se determinó que existían diferencias entre las medias, también se realizó, un Post Hoc Test y comparaciones múltiples de pares de medias, para determinar entre cuales grupos existían diferencias significativas. Observamos diferencia en: a) plaquetas, teniendo mayor concentración de las mismas los sujetos considerados como controles, la diferencia por Post hoc test fue entre trasplantados y normales

$p = .001$  y entre no trasplantados y controles  $.003$ . En cuanto a AST, ALT, FA y GGT existió diferencia significativa entre los grupos de trasplantados y controles y entre los no trasplantados y controles. El BUN mostró diferencia entre los trasplantados y no trasplantados con  $p = .000$  y entre los no trasplantados y controles con una  $p = .046$

Esto tal vez tendría explicación por alteraciones hemodinámicas, en ocasiones con hipotensión y requerimientos transfusionales, que sufren más los pacientes trasplantados que los no trasplantados además de la nefrotoxicidad inherente a la inmunosupresión.

### **3.7 Características del RNA**

Las características propias del RNA en cada uno de los grupos se describe en la siguiente tabla XI, la cual muestra que se encontró mayor concentración de RNA en los controles demostrado por análisis de varianza y corroborado por Post Hoc Test mostrando diferencia significativa predominantemente entre pacientes trasplantados y No trasplantados comparados con controles. Y esto es debido a

que en los controles la muestra se obtenía por laparotomía por lo que la cantidad de tejido era mayor y por ende, la cantidad y la concentración de RNA obtenida era mayor. Sin embargo la pureza fue menor en las biopsias obtenidas mediante laparotomía ya que el tiempo entre la obtención de la muestra y la colocación en nitrógeno líquido era mayor. La pureza del RNA fue mayor en los pacientes cuya biopsia se obtenía en la unidad de radiología intervencionista obtenida mediante biopsia con aguja de Trucut dirigida por ECO, ya que al obtenerse el tejido inmediatamente se introducía en el nitrógeno líquido impidiendo cualquier tipo de contaminación. Se consideraba la pureza del RNA valores entre 1.9 y 2, valores superiores o inferiores al mismo nos hablaban de disminución de la pureza del RNA.

**Tabla XI. Características del RNA obtenido en los diferentes grupos de pacientes**

RNA	Trasplantados	No Trasplantados	Controles	Prueba estadística	p	**
	$\bar{x} \pm 1DE$	$\bar{x} \pm 1DE$	$\bar{x} \pm 1DE$			
Concentración (mg/ $\mu$ L)	366.0974 $\pm$ 232.642	1049.1146 $\pm$ 1829.06	1524,065 $\pm$ 1110.09	6.897	.002	ty nt p=.03 t y cont p=.00
Cantidad ( $\mu$ g)	8.65 $\pm$ 5.65	15.89 $\pm$ 2.89	35.79 $\pm$ 5.04	23.689	.000	ty nt p=.02 not ycont p=.00
Pureza RNA	1.99 $\pm$ .5769	1.62 $\pm$ .5594	1.3718 $\pm$ .4628	9.172	.000	t y nt p=.00 not ycont p=.00

\*ANOVA \*\* Post Hoc Test t= pacientes trasplantados cont= pacientes controles

nt= pacientes no trasplantados

### 3.8 Factor Transformante de Crecimiento Beta (TGF $\beta$ )

Los resultados descriptivos y comparativos del valor del TGF $\beta$ , se determinaron en las tres poblaciones de pacientes y están descritos en la tabla XII.

**Tabla XII. Resultados del RNAmTGF $\beta$  en los diferentes grupos de estudio**

RNAmTGF $\beta$ / GADPH						
	$\bar{x}$	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	Prueba Estadística
Trasplantados	.338670	.229289	.260000	.0238	.9510	* F=5.816 p=.004
No Trasplantados	.406014	.222482	.418600	.0505	.9644	** t y cont p=.015
Controles	.19362	.102418	.174600	.0634	.4058	n t y cont p=.003 t y nt p=.332

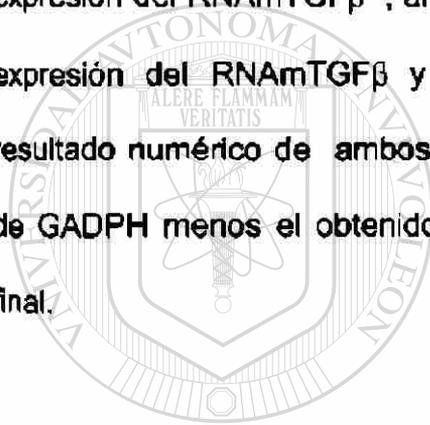
\* ANOVA \*\* Post-Hoc test

t=trasplantados n t = no trasplantados cont= controles

Como se observa en la tabla XII, al realizar la determinación del RNAmTGF $\beta$  en los diferentes grupos de estudio, encontramos diferencias significativas entre los pacientes trasplantados y los controles  $p = .015$  y entre los pacientes no trasplantados y los controles  $p=.003$ , sin embargo no existen diferencias

significativas en la determinación de RNAmTGF $\beta$  entre el grupo de pacientes trasplantados y los no trasplantados  $p=.332$ .

En las siguiente figura 15, tiene tres apartados, a) página 89, corresponde a ejemplos de geles de pacientes trasplantados con su control interno el GADPH, la figura b) página 90, muestra pacientes controles mostrando la expresión de RNAmTGF $\beta$  y su control interno, y la última parte que se muestra en la página 91 c) corresponde a pacientes no trasplantados mostrando en las bandas la expresión del RNAmTGF $\beta$ , al realizar la PCR semicuantitativa para determinar la expresión del RNAmTGF $\beta$  y su control interno el GADPH, obteniéndose el resultado numérico de ambos, y realizándose una sustracción entre el resultado de GADPH menos el obtenido del TGF $\beta$  y el cociente obtenido es el resultado final.



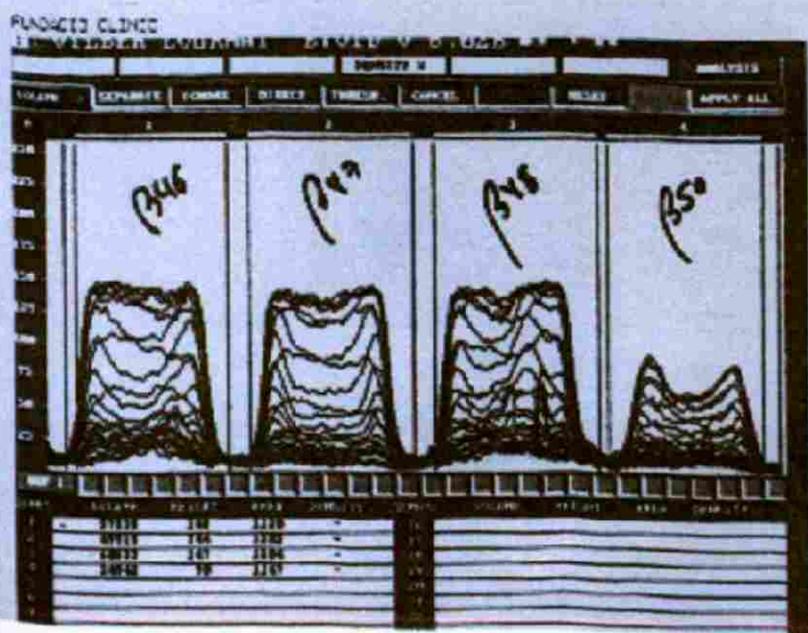
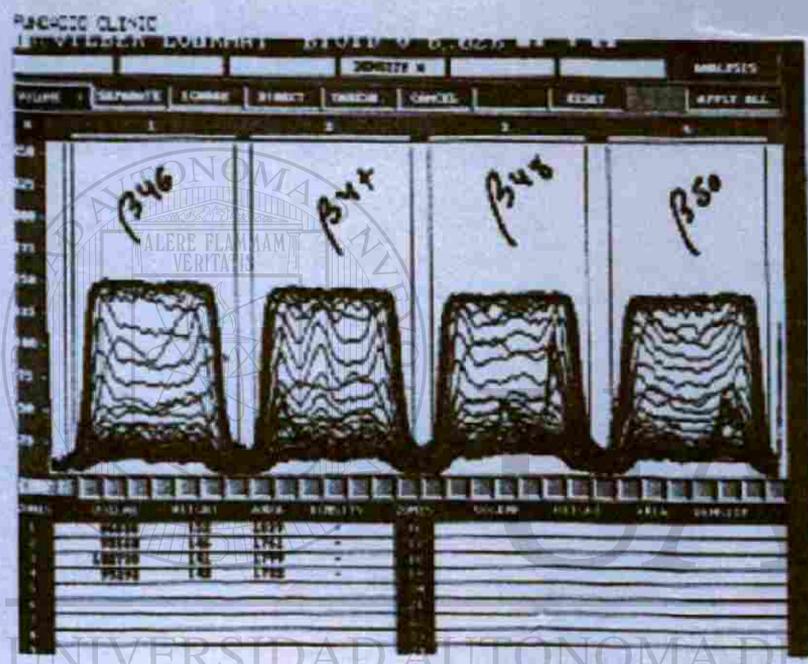
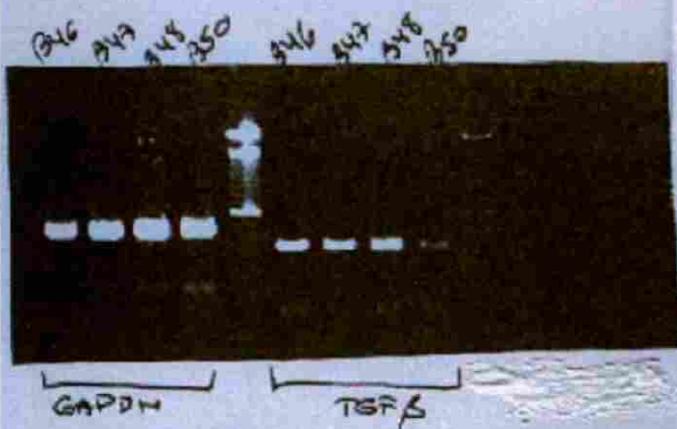
# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

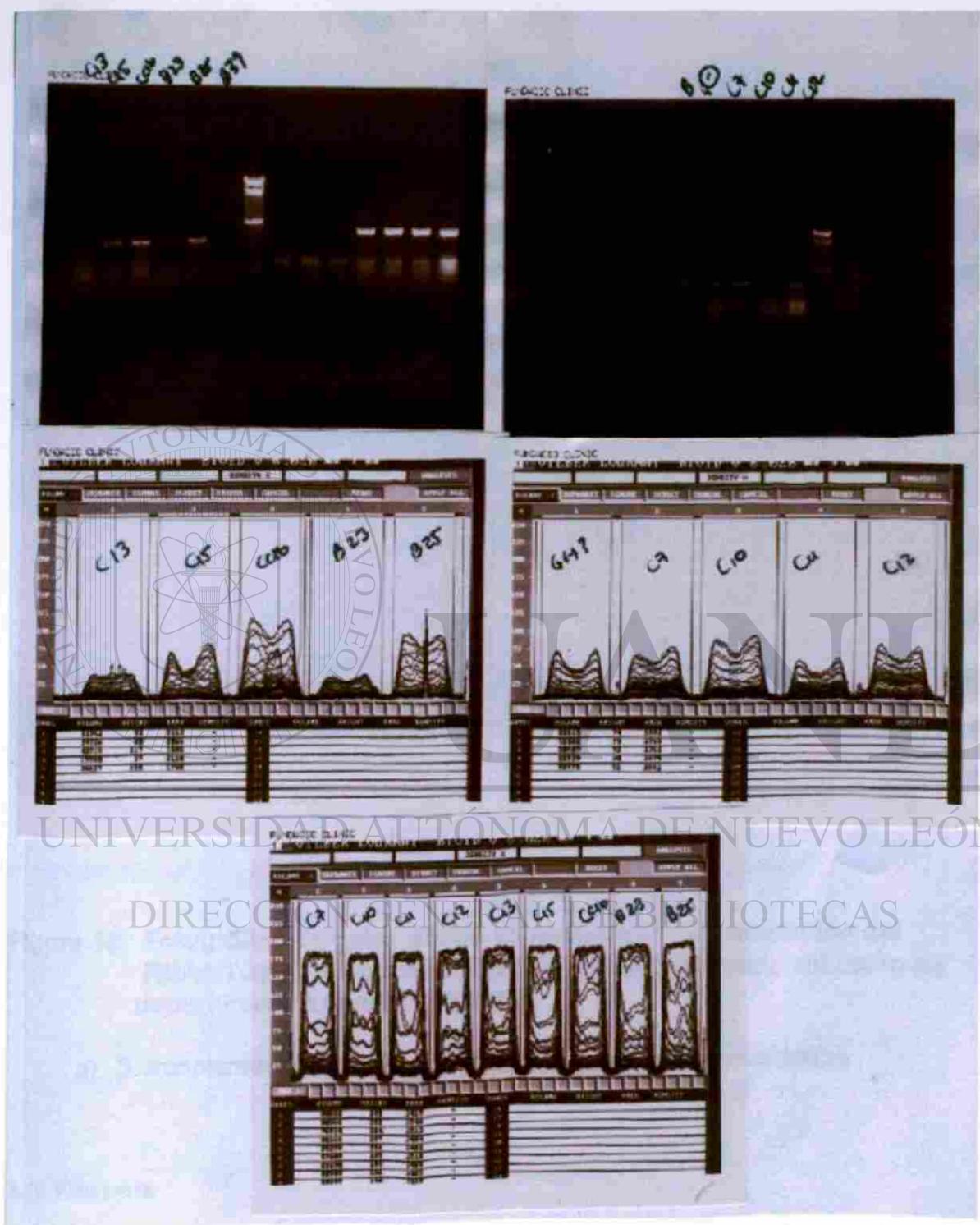


Figura 15  
a)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 15  
b)



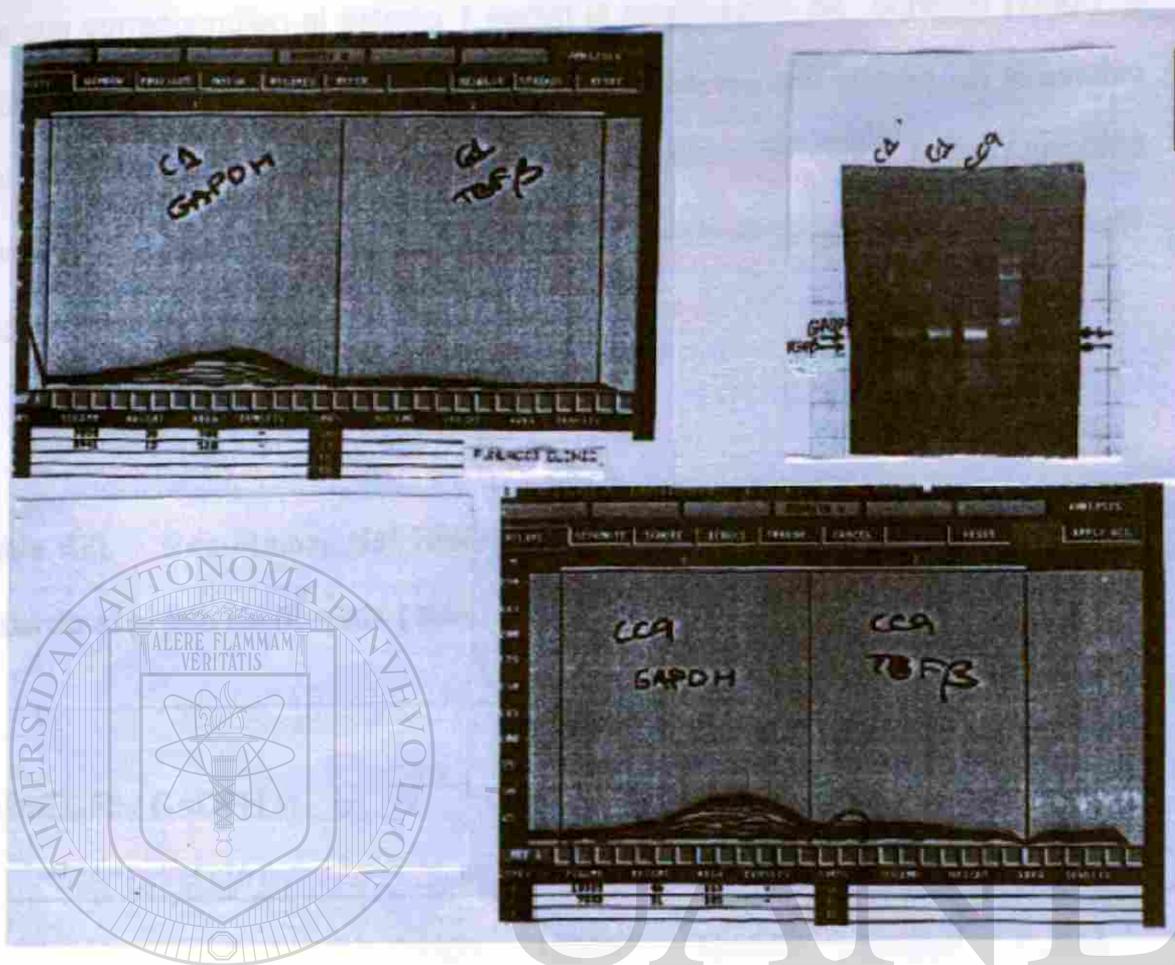


Figura 15  
c)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 15. Fotografías de gels donde se muestra la determinación del RNAmTGF $\beta$  en los diferentes grupos de pacientes, así como su determinación semicuantitativa.**

a)  $\beta$ : trasplantados    b) C: controles    c) CC: no trasplantados

### 3.9 Fibrosis

Si dividimos ambas poblaciones de pacientes trasplantados y no trasplantados de acuerdo al grado de fibrosis en la biopsia hepática y los categorizamos como: Grupo Sin Fibrosis, aquellos pacientes con ausencia de fibrosis; Fibrosis Leve a

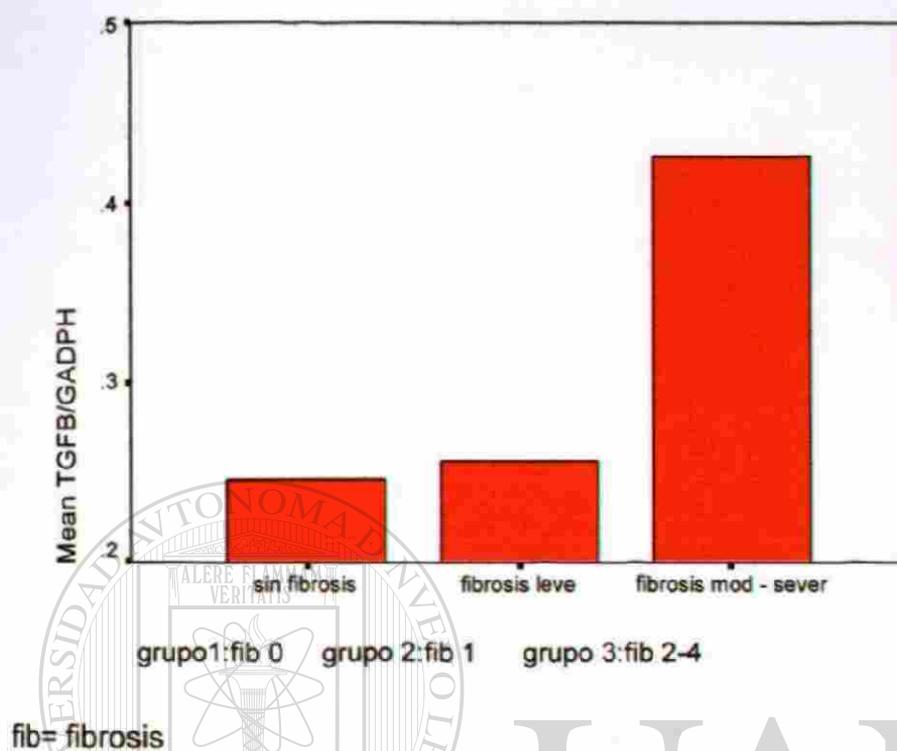
los que correspondían al estadio 1 según la clasificación de Scheuer (179) ; y Fibrosis Moderada a Severa, todos aquellos pacientes con fibrosis en el estadio del 2 al 4, tenemos desde el punto de vista descriptivo los datos de los pacientes trasplantados en la tabla XIII. Notando que a mayor grado de fibrosis, mayor expresión del RNAmTGF $\beta$ .

**Tabla XIII. Resultados del RNAmTGF $\beta$  en los pacientes trasplantados de acuerdo al grado de fibrosis ( leve, moderada, severa) en la biopsia hepática.**

RNAmTGF $\beta$ / GADPH	n	%	$\bar{x}$	DE	Límite Superior	Límite Inferior	Prueba estadística	p
Sin Fibrosis	11	24	.24600	.12093	.164753	.327247	* .354	.016
Fibrosis Leve	12	26	.256650	.230841	.109981	.403319	** .341	.020
Fibrosis Moderada A Severa	23	50	.425783	.241552	.321328	.530238		
Total	46	100	.338670	.229289	.270579	.406760		

\* Correlación de Pearson    \*\* Correlación de Spearman

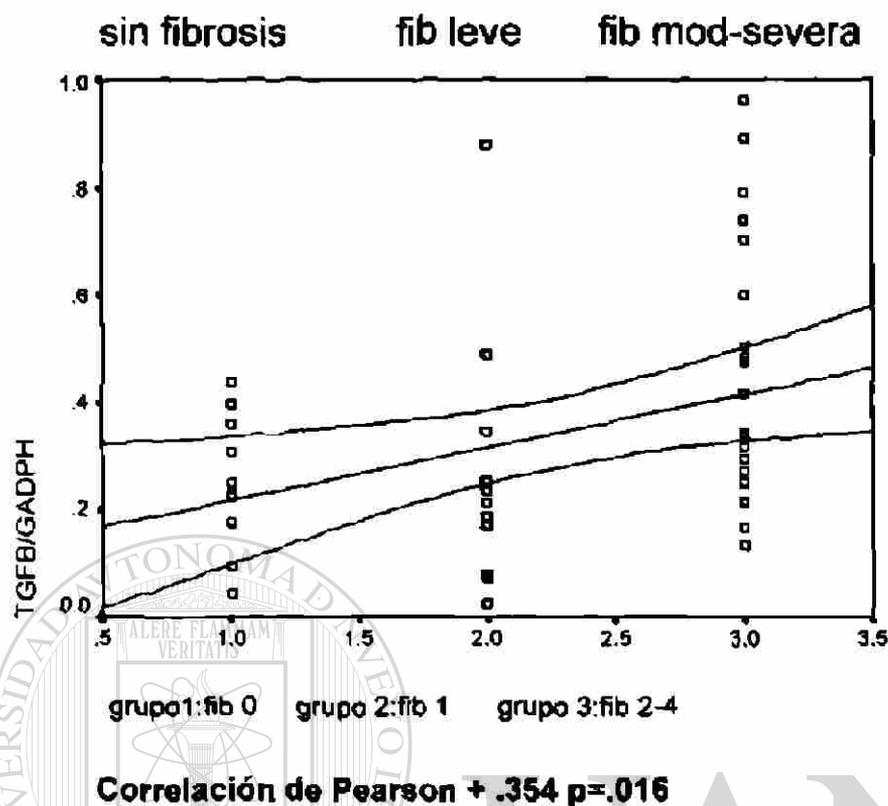
### Pacientes Trasplantados



**Figura 16. Relación entre el RNAmTGFB $\beta$  y el grado de fibrosis en el grupo de pacientes trasplantados con recidiva C.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura 17 .Correlación entre el RNAmTGFβ y el grado de fibrosis**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tanto los resultados de la tabla XIII como las figuras 16 y 17 muestran una clara correlación positiva entre el nivel de RNAmTGFβ y la severidad de la fibrosis, en los pacientes trasplantados.

Ahora al investigar lo mismo en los diferentes grupos de pacientes observamos primero que existen diferencias significativas entre las medias de la expresión del RNAmTGFβ, demostrándose con una prueba de ANOVA ( $F=7.246$ ,  $p = .001$ )y además que existe una correlación positiva entre el nivel del RNAmTGFβ, de acuerdo al grado de fibrosis, encontramos que, a mayor grado de fibrosis, mayor

concentración del RNAmTGF $\beta$ . en los distintos grupos de estudio(Correlación de Pearson  $+0.362$   $p=0.000$ ) Esto se muestra en la tabla XIV..

**Tabla XIV. Resultados comparativos del RNAmTGF $\beta$  entre los diferentes grupos de pacientes en relación al grado de fibrosis (leve, moderada a severa)**

RNAmTGF $\beta$ / GADPH					
Fibrosis	Trasplantados		No Trasplantados		Prueba estadística p
	n	$\bar{x} \pm 1DE$	n	$\bar{x} \pm 1DE$	
Sin Fibrosis	11	.24600 $\pm$ .12093	6	.363567 $\pm$ .131605	17 .193624 $\pm$ .102418 * 7.24 .001
Fibrosis Leve	12	.256650 $\pm$ .230841	4	.466375 $\pm$ .119736	** +.362 .000
Fibrosis Mod a Severa	23	.425783 $\pm$ .241552	25	.406544 $\pm$ .252318	

\* ANOVA \*\*Coeficiente de correlación de Pearson

Al comparar los resultados del nivel del RNAmTGF $\beta$  en los diferentes grupos de pacientes de acuerdo al grado de fibrosis determinada en la biopsia hepática según la clasificación de Scheuer, publicados en 1991(179), tenemos los siguientes resultados descritos a continuación en la tabla XV.

**Tabla XV. Resultados comparativos del RNAmTGF $\beta$  entre los diferentes grupos de pacientes de acuerdo al grado de fibrosis. (según Scheuer)**

Fibrosis	RNAmTGF $\beta$ / GADPH							
	Trasplantados		No Trasplantados		Controles		Prueba	
Estadio * **	n	$\bar{x}$ *	n	$\bar{x}$ **	n	$\bar{x}$	estadística	p
0	11	.246000	6	.363567	17	.193624	* + .351	.017
1	12	.256650	4	.466375			** - .020	.910
2	10	.427470	5	.408060				
3	7	.391171	1	.404532				
4	5	.463350	19	.437200				

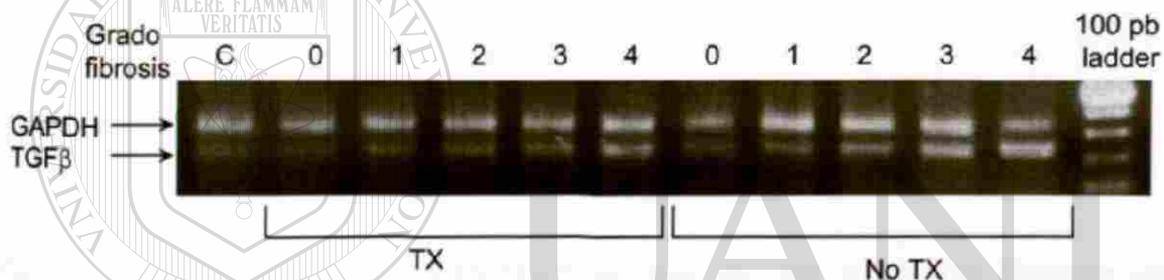
\*Correlación de Pearson: entre estadio de fibrosis y RNAmTGF $\beta$  en trasplantados y \*\* no trasplantados

Al realizar los resultados comparativos entre el nivel del RNAmTGF $\beta$  entre los diferentes estadios de fibrosis observamos una correlación de Pearson positiva y significativa en el grupo de trasplantados ya que a mayor grado de fibrosis, de acuerdo al estadio, mayor es la determinación del RNAmTGF $\beta$  (.351 p= .01) llama la atención que ésta correlación sólo la encontramos en los pacientes trasplantados, ya que en los pacientes no trasplantados no se encuentra correlación del nivel del RNAmTGF $\beta$  en relación al grado de fibrosis.

Para esquematizar lo anterior se muestran las figuras 18 y 19, que muestran la expresión del RNAmTGF $\beta$  y de su control interno el GAPDH, en pacientes trasplantados y no trasplantados de acuerdo al estadio, mostrado en la biopsia hepática.

**Figura 18.**

Expresión de mRNA de TGF $\beta$  en función del grado de fibrosis) en pacientes con trasplante hepático (Tx) y recidiva de hepatitis C y pacientes no trasplantados (no Tx) con hepatitis C, clasificados según el grado de fibrosis histológica (0,1,2,3,4)



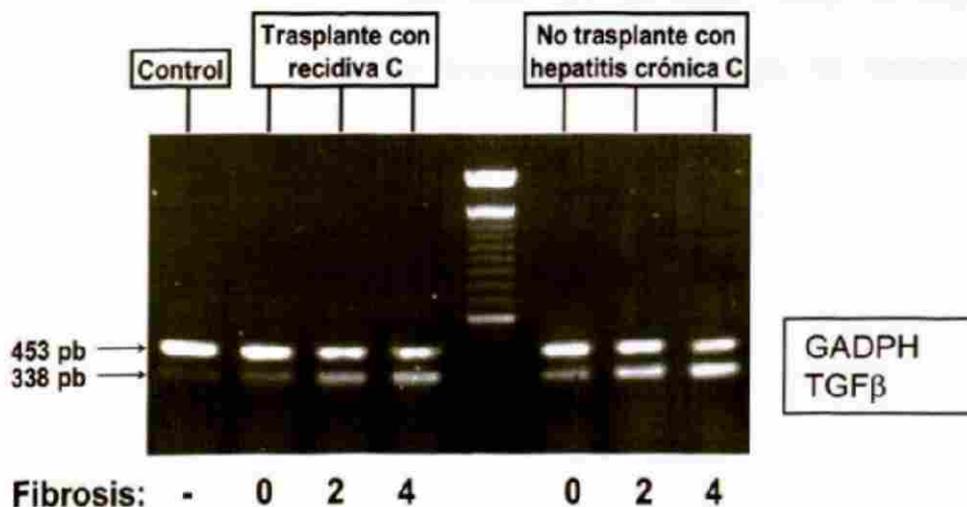
Tx= trasplantados no Tx=no trasplantados C= controles

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

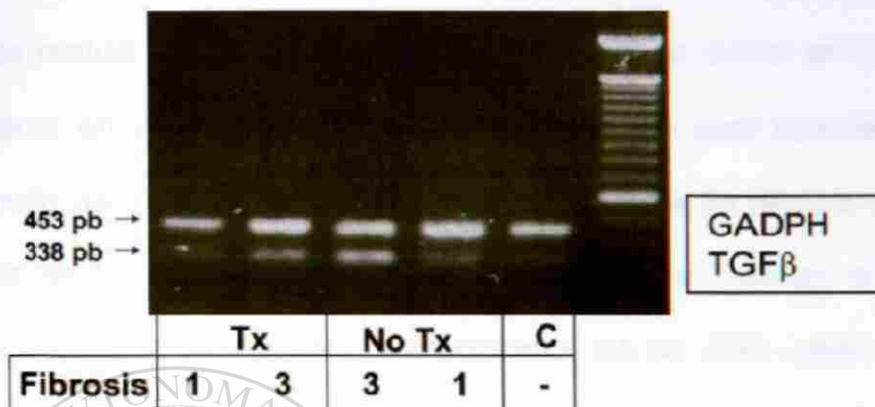
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### EXPRESION DE TGF $\beta$ Y GRADO DE FIBROSIS



## EXPRESIÓN DE TGF $\beta$ PACIENTES CON HEPATITIS C, CON Y SIN TRASPLANTE HEPATICO (Tx)



Tx= trasplantados no Tx=no trasplantados C= controles

**Figura 19. Expresión del RNAmTGF $\beta$  en función del grado de fibrosis en pacientes trasplantados y no trasplantados con hepatitis C, según el grado de fibrosis histológica.**

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las figuras anteriores muestran que a mayor grado de fibrosis determinado por el estadio de acuerdo a la clasificación de Scheuer (179), la expresión del RNAmTGF $\beta$  es mayor tanto en trasplantados como en no trasplantados, sin diferencias entre ambos grupos.

### 3.9.1 Rapidez de progresión a fibrosis

En relación a la rapidez de progresión a fibrosis, se determinó primero la fecha en que se realizó la biopsia hepática actual menos la fecha en que se realizó el trasplante en años, o sea dividido en 365 días, lo cual nos da el tiempo de desarrollo de fibrosis, esto se dividía con el estadio de fibrosis determinado a la revisión de la biopsia hepática, y se representaba en medias, si tenemos que la media del grupo de pacientes trasplantados fue de .704 , todo el desarrollo de fibrosis menor a .704 se clasificó como fibrosis lenta y todo resultado mayor a .704 se clasificó como fibrosis rápida , o sea aquel paciente que desarrolló fibrosis en los primeros 5 años del trasplante, con lo cual obtuvimos los siguientes resultados representados en la tabla XVI.

**Tabla XVI. Resultado del RNAmTGF $\beta$  en relación a la rapidez de progresión de la fibrosis.**

RNAmTGF $\beta$ / GADPH	n	$\bar{x}$	DE	Prueba estadística	p
Fibrosis lenta <.704	32	.291731	.181821	*-2.185	.034
Fibrosis rápida >.704	14	.445957	.292117	** .313	.034

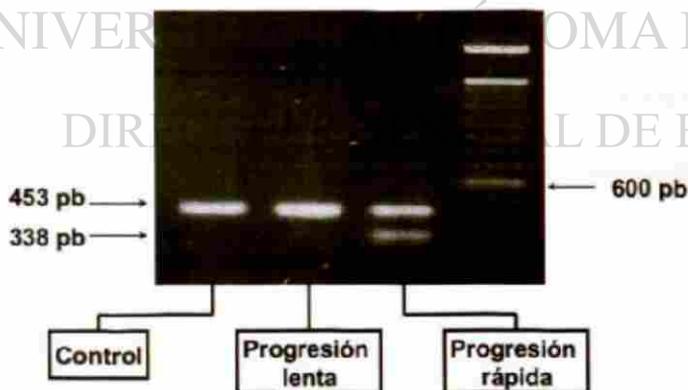
\*t de student \*\* Correlación de Pearson

### 3.1.2 Índice de Progresión de Fibrosis

Al revisar la tabla XV observamos que existe diferencia entre los dos grupos demostrada por la prueba t y que los pacientes con fibrosis lenta tienen menor expresión de RNAmTGF $\beta$  que los que desarrollaron fibrosis rápida. Existe una correlación positiva entre el RNAmTGF $\beta$  y la rapidez de progresión de la fibrosis.

En la figura 20 se demuestra que a mayor progresión de la fibrosis la expresión del RNAm TGF $\beta$  es mayor, mostrando que la banda de TGF $\beta$  que es la marcada en 338 pb se expresa con mayor intensidad que la mostrada en pacientes con progresión lenta de la fibrosis

#### EXPRESIÓN DE TGF $\beta$ Y PROGRESIÓN DE LA FIBROSIS EN PACIENTES CON TRASPLANTE HEPÁTICO Y RECIDIVA DE HEPATITIS C



**Figura 20.** Demostración de la mayor expresión del RNAmTGF $\beta$  en fotografía del gel de agarosa en los pacientes con progresión rápida de la fibrosis versus pacientes que tuvieron progresión lenta.

### 3.9.2 Índice de Progresión de Fibrosis

Para determinar el índice de progresión a fibrosis, nos basamos en artículos publicados previamente por el Dr. Poynard, en pacientes con hepatitis crónica C, tomando en cuenta la mediana de la fibrosis por año desde el trasplante, o sea el grado de fibrosis en la biopsia hepática dividido entre el tiempo en años desde el trasplante, que es la fecha de reinfección del virus de hepatitis C, lo cual nos da el tiempo de desarrollo de la fibrosis.

La media de desarrollo de fibrosis por año entre los 46 pacientes trasplantados por recidiva C postrasplante fue de .704 (0.567 -0.840). con una mediana de .3276.

Para determinar el índice de progresión de la fibrosis establecido por Poynard (146), en 1997, dividimos: estadio 4 que corresponde a cirrosis entre la mediana de desarrollo de fibrosis por año y nos da como resultado, los años que se requieren para el desarrollo de cirrosis en la población de pacientes

trasplantados.

El estadio 4 entre la mediana de progresión de fibrosis (.3276) nos da el Índice de Progresión de la Fibrosis, o sea el tiempo en que desarrollará cirrosis = 12 años.

**Tabla XVII. Índice de Progresión de Fibrosis en los pacientes trasplantados con recidiva C.**

RNAmTGF $\beta$ / GADPH		
Fibrosis /año desde el trasplante		
N	= 46	Índice de Progresión de Fibrosis
Media	= ,7041	Estadio : Mediana
Error estándar	= ,1368	4 : ,3276
Mediana	= ,3276	= <u>12 años</u>
DE	= ,9280	
Mínimo	= ,000	
Máximo	= 3,64	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

De acuerdo a los resultados de la tabla XVII tenemos que en nuestro grupo de 46 pacientes trasplantados con recidiva C, la duración mediana de progresión a cirrosis fue de 12 años.

A diferencia de la progresión de cirrosis esperada en un paciente con hepatitis crónica C no inmunocomprometidos, según estudios del Dr. Poynard es de 30 años (28-32) (146); por lo que notamos que la progresión de fibrosis en los pacientes trasplantados con recidiva C se acorta de 30 años a 12 años.

### 3.10 Grado de Inflamación

De acuerdo al grado de inflamación encontrado en el estudio anatomopatológico de la biopsia hepática, siguiendo los lineamientos de Scheuer (179), donde se evalúa el grado de actividad necroinflamatoria, como actividad portal, lobulillar y la suma de ambas como actividad global, de acuerdo a esto categorizamos en inflamación leve cuando la escala era menor o igual a 2 e inflamación moderada a severa cuando la puntuación era de 3 ó más. Tomando en cuenta éstos lineamientos se expresan los resultados en la tabla XVII, donde el grado de inflamación calculado en la biopsia hepática de los pacientes trasplantados, no muestra relación significativa con el nivel del RNAmTGF $\beta$ . Ni en pacientes trasplantados, ni en pacientes no trasplantados, lo cual nos habla que no hay relación alguna del RNAmTGF $\beta$  con la inflamación hepática.

Lo mismo se demuestra en la figura 21 donde se trata de observar la relación entre el grado de inflamación el nivel de RNAmTGF $\beta$  y el tipo de inmunosupresor usado no encontrándose diferencias en ambos grupos

**Tabla XVIII. Resultados comparativos del RNAmTGF $\beta$  entre los diferentes grupos de pacientes en relación al grado de inflamación.**

Inflamación	RNAmTGF $\beta$ / GADPH						
	Portal + Lobulillar		Trasplantados **		No Trasplantados***		Prueba estadística *
** ****	n	%	$\bar{x} \pm 1DE$	n	%	$\bar{x} \pm 1DE$	p
Inflamación Leve	19	41.3	.302211 $\pm$ .208656	13	37.1	.424338 $\pm$ .243798	* -.507 NS ** .261 NS
Inflamación Mod a Severa	27	58.9	.364326 $\pm$ .243303	22	62.9	.39518 $\pm$ .214115	***.046 NS ****F=.815 NS

t de Student \*\* Correlación entre el RNAmTGF $\beta$  y el grado de inflamación en trasplantados y \*\*\* no trasplantados \*\*\*\*ANOVA

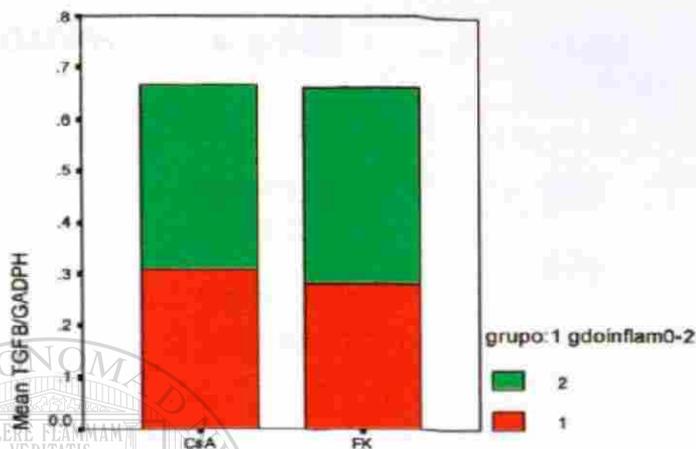
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

En la figura 21, se demuestra que no existe diferencia entre el tipo de inmunosupresor usado, el nivel de RNAmTGF $\beta$ , y el grado de inflamación, en la biopsia hepática.

## Resultados

### Pacientes Trasplantados



grupo 1: inflamación leve

grupo 2 = inflamación moderada a severa

CsA= ciclosporina FK= tacrolimus

**Figura 21. Relación del grado de Inflamación, el nivel del RNAmTGF $\beta$  y el tipo de Inmunosupresor usado.**

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.11 Tipo de Inmunosupresor usado

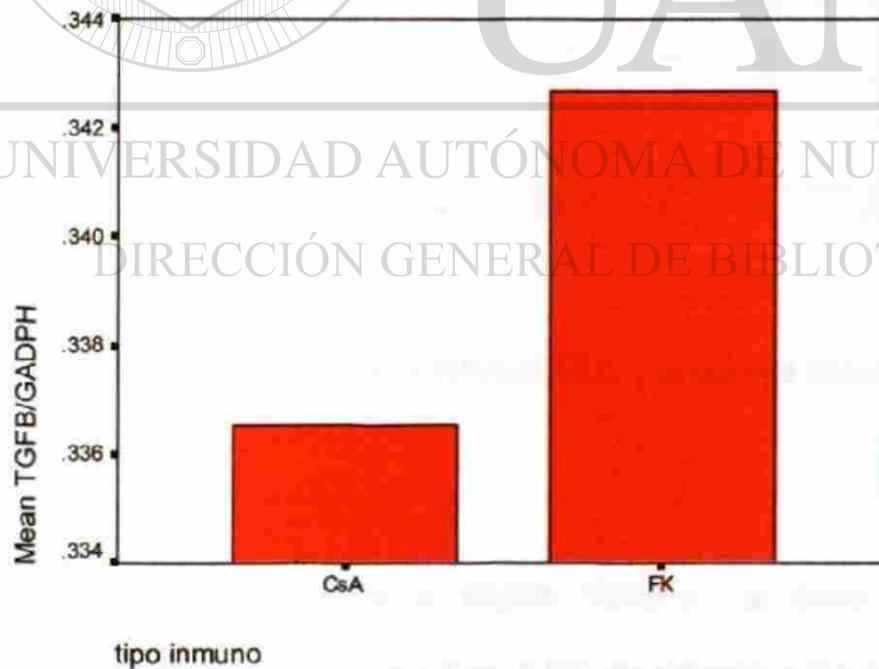
Se buscó relación entre el tipo de Inmunosupresor usado y la expresión del RNAm TGF $\beta$ , para lo cual se estudiaron 46 pacientes trasplantados, 30 (65%) con uso de CsA y 16 pacientes (35%) con uso de FK. No se encontró relación significativa entre el tipo de Inmunosupresor calcineurínico usado y el nivel de RNAmTGF $\beta$  en los pacientes Trasplantados. Lo cual muestra en la tabla XVIII.

**Tabla XIX. Resultados comparativos del RNAmTGF $\beta$  en los pacientes trasplantados en relación al tipo de Inmunosupresor usado**

RNAmTGF $\beta$ / GADPH	$\bar{x} \pm 1$ DE	Prueba estadística	p
CsA n = 30 (65%)	.336533 $\pm$ .227972	* -.086	NS
FK n = 16 (35%)	.342675 $\pm$ .239199	** .013	NS

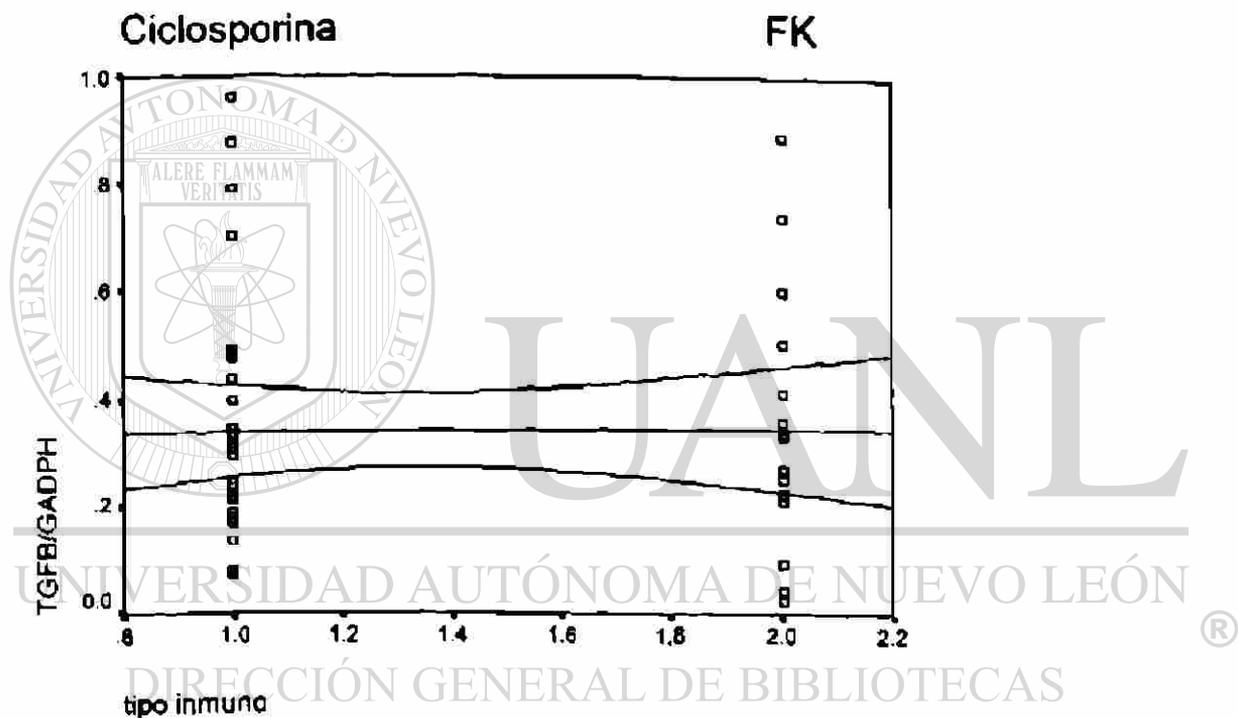
\* prueba t de Student \*\*Correlación de Pearson

**Tipo de Inmunosupresor y RNAmTGF $\beta$**



**Figura 22. Relación entre el RNAmTGF $\beta$  y el tipo de Inmunosupresor usado.**

En la figura 22, pareciera haber diferencias en relación al nivel de RNAm TGF $\beta$  y el tipo de inmunosupresor usado: CsA o FK, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico. Notando en la figura 24 ausencia de correlación, es decir, relación lineal entre nivel de RNAmTGF $\beta$  y el tipo de Inmunosupresor usado.



**Figura 23. Correlación entre el RNAmTGF $\beta$  y el tipo de Inmunosupresor Usado.**

Se buscó la relación entre el RNAm TGF $\beta$  y la dosis acumulada de el inmunosupresor usado, ya fuera CsA o FK en relación a los años de su uso, no encontrándose diferencias significativas, excepto en el grupo que incluye mayor número de pacientes, los pacientes trasplantados entre 1 a 5 años postrasplante,

tal vez si se aumentara el tamaño de la muestra entre los demás grupos, habría diferencias significativas. Éstos resultados se expresan en medias y desviación estándar en la tabla XX.

**.Tabla XX. Resultado de RNAmTGF $\beta$  en relación de la dosis acumulada del inmunosupresor usado clasificado de acuerdo a los años de su uso.**

Tiempo del TH	Dosis acumulada			Dosis acumulada			Prueba estadística	p
	Ciclosporina*		RNAmTGF $\beta$	Tacrolimus**		RNAmTGF $\beta$		
	n	$\bar{x} \pm 1DE$	$\bar{x} \pm 1DE$	n	$\bar{x} \pm 1DE$	$\bar{x} \pm 1DE$		
< 1 año	5	80680 $\pm$ 23716.3	.32928 $\pm$ .306607	0	NA	NA	*.057	NS
1- 5 años	13	229871 $\pm$ 136792	.217446 $\pm$ .113411	13	2450.50 $\pm$ 2164.00	.357246 $\pm$ .237295	**-.014	NS
6 -10 años	5	443255.50 $\pm$ 244708.3	.407000 $\pm$ .267577	2	6682.5 $\pm$ 818.12	.407400 $\pm$ .264034		
+ de 10 años	7	578253.57 $\pm$ 116754.10	.447883 $\pm$ .188757	1	2090.0	.0238		
Total pacientes	30			16				

\*Correlación de Pearson: entre tiempo de trasplante y uso de CsA

\*\* Correlación de Pearson: entre el tiempo del trasplante y uso de FK

\*\* NA= no aplica

Lo mismo se demuestra en la siguiente figura dónde no existe diferencia entre el tipo de inmunosupresor usado, el nivel de RNAmTGF $\beta$  y el grado de fibrosis en la biopsia hepática

## Resultados

### Pacientes Trasplantados

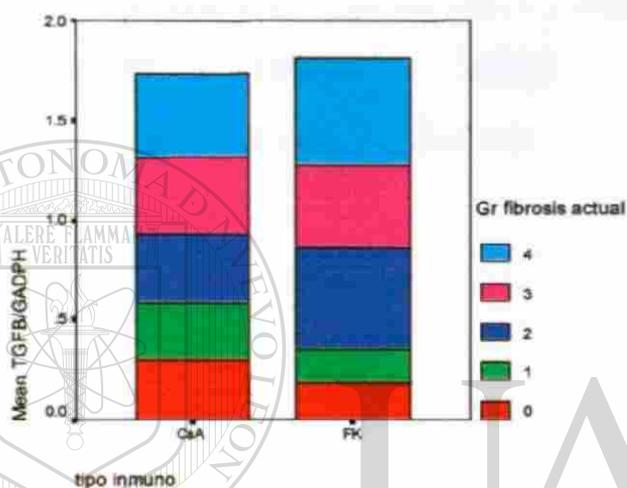


Figura 24. Relación del RNAmTGF $\beta$  de acuerdo al grado de fibrosis y al tipo de inmunosupresor usado.

El esquema inmunosupresor usado incluía aparte de un inhibidor de la calcineurina, ya fuera CsA o FK, esteroides, por lo que se determinó además la correlación con la dosis acumulada de esteroides que se ejemplifica en la siguiente tabla XX.

**Tabla XXI. Correlación entre el RNAmTGF $\beta$  y la dosis acumulada de corticoesteroides**

RNAmTGF $\beta$ / GADPH	n	$\bar{x}$	DE	Prueba estadística * Sig ( 2 colas) p
RNAmTGF $\beta$	46	.338670	.229289	*-0.94 NS
Dosis acumulada De corticoesteroides	46	.13636	25167.83	

\*Correlación de Spearman

### 3.12 Variables diversas

Se buscó correlación del RNAmTGF $\beta$  con otras variables, como son edad en años, genotipo, carga viral, nivel de transaminasas, AST, ALT, bilirubina, fosfatasa alcalina, gamaglutamintraspeptidasa, albúmina no encontramos diferencias significativas, los resultados se muestran en la tabla XXII.

Tabla XXII. Correlación del RNAmTGF $\beta$  con variables diversas

RNAmTGF $\beta$ / GADPH	$\bar{x}$	DE	Prueba Estadística *	p Sig ( 2 colas)
RNAmTGF $\beta$	.338670	.229289		
Edad del receptor	57.51	7.84		.114 NS
Viremia	** 1 760534	1623847.32	F=	.071 NS
Genotipo	** 1.16667	.7213	F=	1.253 NS
Rechazo	** 1.54	.50	F=	.008 NS
Bolos de cortis	1.54	.50		-.058 NS
AST	80.76	65.49		.228 NS
ALT	98.35	82.62		-.023 NS
FA	252.39	93.86		.017 NS
GGT	145.28	208.83		-.171 NS
BT	1.41	1.25		.117 NS
Albúmina	42.59	4.24		-.210 NS

\*Correlación de Spearman \*\* ANOVA

Sin embargo al correlacionar el nivel del RNAmTGF $\beta$  con el sexo si encontramos diferencias significativas, lo cual se muestra en la tabla XXIII.

**Tabla XXIII. Correlación entre el RNAmTGF $\beta$  y el sexo del receptor**

	n	$\bar{x}$	DE	Mínimo	Máximo	Prueba estadística	p
RNAmTGF $\beta$	46	.338670	.229289	.0238	.9510	*.344	.019
sexo masculino	31	.292726	.223747	.0238	.9591	**2.019	.050
sexo femenino	15	.433620	.217657	.1645	.8861		

\* Correlación de Spearman \*\* t de Student

Observamos una correlación positiva entre sexo y RNAmTGF $\beta$  con un incremento en el nivel de RNAmTGF $\beta$  en el sexo femenino sobre el masculino.

Los mismos datos se muestran en la siguiente figura, donde se demuestra el nivel de RNAmTGF $\beta$  en función del sexo del receptor.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

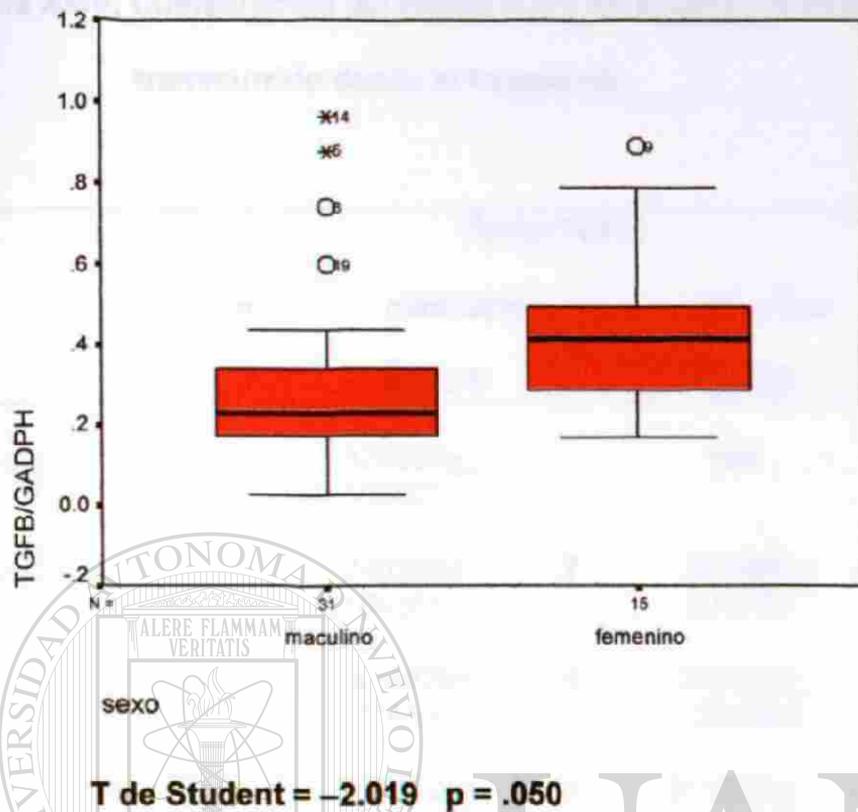


Figura 25. Relación entre el RNAmTGFB y el sexo del receptor

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Si categorizamos el grupo de pacientes trasplantados por sexo y el tiempo que tienen desde que se realizó el trasplante, los resultados se esquematizan en la tabla XXIV. Dónde se muestran diferencias significativas entre ambos sexos en las pacientes femeninas con menos de 5 años postrasplante, dónde el nivel del RNAmTGFB se encontró en mayor cantidad.

**Tabla XXIV. Comparación del RNAmTGF $\beta$  de acuerdo al sexo y al tiempo transcurrido desde el trasplante.**

	RNAmTGF $\beta$				
	n	masculino	n	femenino	Prueba estadística
		$\bar{x} \pm 1DE$		$\bar{x} \pm 1DE$	* p
< 1 año	5	.329280+ .306607		NA	
1-5 años	16	.240394+ .169361	7	.413886+ .231706	2.023 .050
5-10 años	7	.416929+ .274501	4	.389825+ .250680	.162 NS
>10 años	3	.221100+ .186582	4	.511950+ .198037	-1.968 NS

\* t de student

Se conoce por datos de la UNOS que existe una interacción entre el sexo del receptor, la infección de VHC y la evolución del trasplante y la sobrevida del injerto, que al parecer es menor en el sexo femenino, aunque nosotros encontramos una correlación positiva entre el sexo femenino y el nivel de RNAmTGF $\beta$ , sin embargo no existe correlación entre el sexo y el índice de progresión de la fibrosis, como se muestra a continuación.

**Tabla XXV. Velocidad de progresión de la fibrosis en relación al sexo del Receptor.**

	Velocidad de progresión de la fibrosis				Índice de progresión a cirrosis	
	n	%	$\bar{x}$	DE	mediana	
Sexo Masculino	31	68	.7935	1.0692	.4946	8.08
Sexo Femenino	15	32	.5194	.5224	.2676	14.94

Correlación de Pearson:  $-.140$   $p = NS$  t de student  $t = .938$   $p = NS$

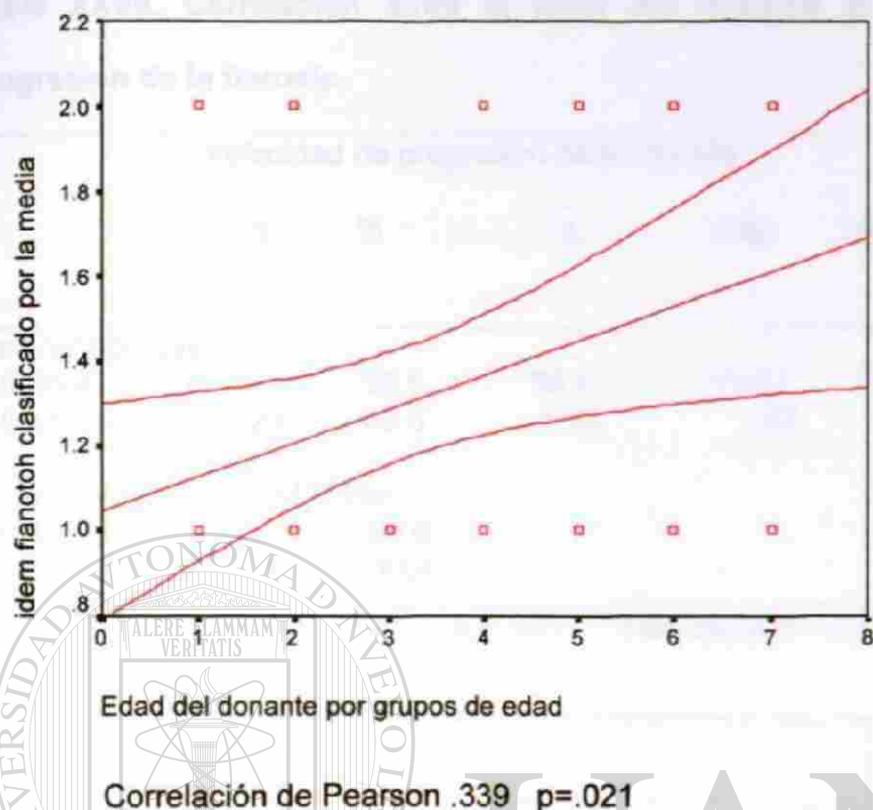
Ahora si tomamos en cuenta los datos del donante tenemos que: Si correlacionamos la edad del donante en grupos de edad, encontramos una correlación positiva y estadísticamente significativa, ya que a mayor edad del donante la velocidad de progresión de la fibrosis es mayor en el receptor. Observamos además en la siguiente tabla, el índice de progresión a cirrosis descrito por Poynard (146), encontrando que cuando la mediana de edad del donante tuvo la más lenta progresión a cirrosis fue el grupo comprendido entre los 31 a 40, desarrollando cirrosis en 32.23 años y la más rápida progresión a cirrosis

correspondiente a 2.7 años, se encontró cuando la mediana en la edad del donante se encontraba entre 71 a 80 años.

Lo anterior se ejemplifica en la tabla XXVI, y en la figura 26.

**Tabla XXVI. Correlación entre la edad del donante categorizado por grupos de edad y la velocidad de progresión de la fibrosis en el receptor**

	Velocidad de progresión de la fibrosis		$\bar{x}$	DE	mediana	Índice de progresión a cirrosis
	n	%				
Edad del donante	46	100	3.22	1.97	.3276	12.21
Por grupos						
10-20	12	26.1	1.17	.39	.3276	12.21
21-30	9	19.6	1.22	.44	.2126	18.81
31-40	5	10.9	1.00	.00	.1241	32.23
41-50	8	17.4	1.50	.53	.7061	5.66
51-60	5	10.9	1.40	.53	.5630	7.10
61-70	3	6.5	1.33	.58	.6541	6.11
71-80	4	8.7	1.75	.50	1.4587	2.74



**Figura 26. Correlación entre la edad del donante categorizado por grupos de edad y la velocidad de progresión de la fibrosis en el receptor**

Si categorizamos a los donantes en grupos de mayor de 40 años y menor de 40 años y lo correlacionamos con la velocidad de progresión de la fibrosis observamos que. Al usarse donantes cada vez de mayor edad, tiene una correlación positiva con la velocidad de progresión de la fibrosis en el receptor, ya que, en donantes menores de 40 años, el índice de progresión a cirrosis fue de 17.34 años contra 5.71 años si el donante era mayor de 40 años, lo siguiente se ejemplifica en la tabla XXVII y el la figura 27.

**Tabla XXVII. Correlación entre la edad del donante y la velocidad de progresión de la fibrosis.**

	Velocidad de progresión de la fibrosis				índice de progresión a cirrosis	
	n	%	$\bar{x}$	DE	mediana	
<b>Edad del donante</b>						
< 40 años	26	56.5	38.5	19.47	.2306	17.34 *
> 40 años	20	43.5	1.30	.47	.6995	5.71
<b>Vel de progresión de la fibrosis</b>						
Fibrosis lenta	32	69.6				
Fibrosis rápida	14	30.4				

Correlación de Pearson: .339  $p = .021$  \* t de Student: -2.371  $p = .022$



Correlación de Pearson .328  $p = .026$

**Figura 27. Correlación entre la edad del donante y la velocidad de progresión de la fibrosis en el receptor**

## CAPITULO IV

### DISCUSION

El Hepatitis por virus C, es la indicación más importante en la actualidad para el trasplante hepático, tanto en los centros de Europa como en Estados Unidos de Norteamérica, sin embargo, la recidiva del virus C en ellos, es universal ,presentando en los primeros meses postrasplante cuadro de hepatitis aguda en 25-45% de los pacientes, seguido por hepatitis crónica del 80-100% de los pacientes trasplantados, con desarrollo de cirrosis en el injerto, en un rango que va de un 3 a un 33% de los casos en un lapso aproximado de 5 años(157 ). Lo anterior ha sido observado al revisar las publicaciones de diferentes autores, sobre la historia natural de la recidiva C postrasplante (152-159), concordando todos ellos en que existe fibrosis acelerada del injerto, en un período de tiempo corto. Por lo cual se han postulado diferentes factores, entre los que destacan:

Factores relacionados con el virus, como son: la carga viral, el genotipo y las quasiespecies;

Factores relacionados con el donador, como serían la edad y el sexo;

Factores relacionados al procedimiento quirúrgico: como el tiempo de isquemia;

Factores externos, dónde se encontraría el tipo de inmunosupresión usado, la coinfección viral, el año en que se realizó el trasplante, y la terapia antiviral; Y

factores relacionados al huésped, como serían el sistema de histocompatibilidad, la raza y el sistema inmune.

El factor transformante de crecimiento  $\beta$ , ha sido implicado en la fibrogénesis en pacientes con enfermedades crónicas del hígado, tanto en hepatitis crónica como en cirrosis, siendo la isoforma TGF $\beta$ -1, la más relacionada a fibrosis, teniendo que es un mediador molecular de la fibrosis tisular, y su incremento es directamente proporcional con el aumento del RNAmde la colágena tipo 1 (98,100). Por medio de tinciones de inmunohistoquímica en la biopsia hepática se determinó la proteína TGF- $\beta$ 1 en pacientes con hepatopatía crónica en las áreas de fibrosis, pero no en las áreas de enfermedad inactiva, ni en áreas de tejido normal (192). También se ha observado incremento del TGF $\beta$  en enfermedad venooclusiva (129). Sin embargo la relación entre el TGF $\beta$  y la fibrosis no está limitado solamente al hígado, lo cual ha sido estudiado por numerosos autores, quienes han hallado también dicho incremento en otras enfermedades y su asociación a fibrosis como a nivel renal en la glomerulonefritis (193), en la nefropatía diabética (194), en el rechazo del injerto postrasplante renal (82, 98,195), en enfermedades pulmonares como serían la fibrosis idiopática (129) y la fibrosis de origen autoinmune (196). En dermatología se ha asociado el incremento de la expresión del RNAmTGF $\beta$  a la esclerosis sistémica (197), a la aparición de cicatriz queloide (198), a las cicatrices hipertróficas postquemaduras (199) y al síndrome de eosinofilia-mialgia(200). En el área vascular se asocia a la reestenosis vascular arterial (201). En el sistema nervioso central se ha observado una correlación positiva entre el TGF $\beta$  y la fibrosis intraocular(202) y se menciona además su incremento en la artritis reumatoide (203).

La síntesis de TGF- $\beta$  varía entre individuos y esto depende principalmente de aspectos hereditarios en el gen que expresa el TGF $\beta$ , lo cual implica en algunos individuos, mayor riesgo de fibrosis. Así, si el órgano trasplantado es obtenido de un individuo con genotipo altamente productor de TGF $\beta$ , en un paciente receptor genéticamente del mismo tipo, el riesgo de rechazo agudo y rechazo resistente a esteroides es mayor., lo cual se ha observado del mismo modo en el rechazo crónico. Existen varios estudios en pacientes postrasplantados de riñón y de pulmón que muestran incremento en la expresión del RNAmTGF $\beta$  y de la expresión de la proteína total del TGF $\beta$  (80,81,82,83). La síntesis de TGF- $\beta$  varía de manera individual, siendo determinada en el órgano trasplantado por una serie de insultos; los que pueden ser inmunológicos, daño causado por anticuerpos y por la respuesta inflamatoria ( IFN. $\gamma$  , TNF $\alpha$ ), así como factores no inmunológicos como la isquemia de reperfusión, la infección por citomegalovirus, la hipertensión arterial, la hiperlipidemia y la hiperfiltración, donde al haber daño endotelial, se producen una serie de citocinas, y factores de crecimiento, entre ellos el TGF- $\beta$ , cuya función es tratar de reparar el daño. Del mismo modo han surgido en los últimos años gran cantidad de artículos que miden citocinas, especialmente TGF $\beta$ , en muestras de plasma y suero, que( técnicamente no es lo mismo, ya que las plaquetas son la fuente principal de TGF- $\beta$  como resultado de la degradación de las mismas durante el proceso de formación de coágulo *in vitro*, por lo que sería mejor medirlo en suero) , sin embargo no reportan el uso de ninguna medida para detectar daño plaquetario en suero, basándose en lo reportado por Gainger y cols(204 ), que dicen no encontrar diferencias entre suero y plasma para la

medición del TGF- $\beta$  total o la forma activa. Lo ideal sería usar técnicas bien validadas para la determinación de TGF- $\beta$  (205), debido a que es un marcador inespecífico y puede elevarse en cualquier proceso inflamatorio fibrótico del organismo.

Por lo anterior decidimos realizar la determinación directamente del tejido hepático, mediante RT-PCR, la cual es la técnica de elección para detectar poca cantidad de RNAm en muestras de tejido pequeñas, técnica ya validada por el Dr. Didier Auboeuf en Lyon, Francia (176) modificada por centrifugación con Cloruro de Cesio para lograr obtener mayor cantidad y mayor pureza del RNA, que hasta el momento se había realizado por técnicas de Northern-blot. Nuestros hallazgos muestran que, al hacer la determinación del RNAmTGF $\beta$ , directamente en tejido hepático, para observar la influencia que éste pudiera tener en la fibrosis y en la rapidez de progresión de la misma, en los pacientes con trasplante hepático secundario a hepatopatía crónica C y recidiva del virus de la hepatitis C postrasplante, se ha demostrado en éste estudio que el TGF $\beta$  juega un papel importante en la fibrosis del injerto en los pacientes con trasplante hepático y recidiva C, se demostró que el RNAmTGF $\beta$  se expresa en el tejido hepático, independientemente del grado de lesión encontrado en la biopsia hepática; que la expresión es más intensa cuanto mayor es el grado de fibrosis, encontrando una correlación positiva, a mayor grado de fibrosis mayor expresión del RNAmTGF $\beta$ , así mismo que la expresión de éste factor se ve incrementada y muestra una correlación positiva en pacientes con mayor rapidez de progresión a fibrosis, o sea el hecho que el nivel de RNAmTGF $\beta$  es mayor en pacientes que desarrollan

fibrosis rápida, en comparación con quienes desarrollan fibrosis lenta. Por lo tanto, el TGF $\beta$  podría ser una diana para futuras intervenciones terapéuticas en éstos pacientes...

Se ha reportado en la literatura, por Poynard (146) un índice de progresión a cirrosis de 30 años entre los pacientes con hepatitis crónica secundaria al virus de la hepatitis C. En nuestro trabajo encontramos que el índice de progresión a cirrosis en los pacientes con trasplante hepático y recidiva del virus de la hepatitis C fue de 12 años, lo cual nos muestra una clara disminución en el tiempo de desarrollo de cirrosis en el paciente inmunocomprometido.

Sin embargo un dato importante, es el hecho de que no se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión del RNAmTGF $\beta$  en pacientes trasplantados con recidiva C y en pacientes no trasplantados con los diferentes estadios de la hepatitis crónica C, lo cual sugiere que existen otros mecanismos profibrogénicos activados y/o que los mecanismos colagenolíticos están disminuidos, para poder justificar la progresión acelerada del depósito de colágena en el injerto hepático de éstos pacientes. La mayor rapidez de progresión de la fibrosis en los pacientes trasplantados con recidiva C, debe ser multifactorial y secundaria a mecanismos no reflejados por el grado de expresión del TGF $\beta$ . Quedó demostrado que la expresión del RNAm TGF $\beta$  no tiene ningún efecto sobre el grado de respuesta inflamatoria determinado en el tejido hepático por estudio anatomopatológico.

Sin embargo el estímulo crónico promueve la fibrosis y un aumento de la síntesis de componentes de matriz extracelular. (81,133). Del mismo modo, en pacientes

con trasplante renal, cardíaco y pulmonar, se demostró que existía influencia del tipo de inmunosupresor fundamental (inhibidores de la calcineurina: Ciclosporina o Tacrolimus) y el mayor o menor estímulo sobre la producción de TGF $\beta$  (124-127), teniendo la Ciclosporina un efecto estimulador sobre la producción de TGF $\beta$  y el Tacrolimus (FK-506) un efecto frenador sobre el mismo, (131-133). Este posible efecto regulador de la ciclosporina y el tacrolimus sobre el TGF $\beta$  no había sido investigado en el trasplante hepático, aunque existe una cita en la literatura del Dr. Mohamed Mostafa (133), en el que realizó análisis de inmunofluorescencia semicuantitativo de TGF $\beta$ 1 en biopsias hepáticas de pacientes postrasplantados, donde se determinó la forma activa del TGF- $\beta$ 1 en bajas cantidades en el donador del tejido, pero esto se veía incrementado a los 6 días del trasplante en aquellos que ingerían ciclosporina, a diferencia de los que usaban tacrolimus, sin embargo, la muestra de pacientes fue pequeña por lo que no se pudieron hacer conclusiones válidas;

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El segundo punto que deseábamos investigar era si los inmunosupresores tenían alguna influencia sobre el grado de fibrosis, encontrando que a diferencia de lo que estaba previamente descrito en trasplante renal, cardíaco y pulmonar, notamos que la intensidad de la expresión del RNAm TGF $\beta$  no se ve influida por el tipo de Inmunosupresor anticalcineurínico usado, por lo que pueden usarse de manera indistinta cualquiera de los dos inhibidores de la Calcineurina, ya sea Ciclosporina o Tacrolimus, en el paciente trasplantado por hepatopatía crónica secundario a virus C concluyendo que no son factores determinantes en la recidiva C postrasplante. Ya había sido previamente descrito la ausencia de

correlación entre el tipo de inmunosupresor usado y el nivel del RNAm TGF $\beta$  por diferentes autores, el Dr. Michel I Nicholson de Gran Bretaña, quien describe que el TGF $\beta$  tiene influencia fibrogenica en el trasplante renal, sin embargo no existieron diferencias significativas entre receptores tratados con Cs o FK. El encuentra otros genes profibrogénicos que pudieran estar implicados como son la colágena tipo III, TIMP1, TIMP 2 y tenascina incrementado en pacientes que reciben CsA que los que reciben FK. Hughes et al (205), han descrito también que no existieron diferencias entre la terapéutica de CsA o FK en concentraciones séricas de la forma activa del TGF $\beta$ , a diferencia de lo que estaba anecdóticamente descrito en la literatura (205).

El Dr. David Multimer y cols.(170) del Hospital Queen Elizabeth y la Universidad de Birmingham , Gran Bretaña, recientemente han publicado un artículo donde revisaron 101 biopsias postrasplante, de 56 pacientes trasplantados por infección de virus de hepatitis C, para determinar el rango de progresión de fibrosis y su asociación entre la edad y sexo del donante, encontrando un rango medio de progresión de fibrosis de .78 unidades por año postrasplante, en pacientes cuyo donante fue menor de 40 años el tiempo para desarrollar cirrosis fue de 10 años, contra 2.7 años cuando la edad del donante fue más de 50 años. En nuestro estudio encontramos una correlación positiva entre la edad del donante y la velocidad de progresión de la fibrosis en el receptor, con un punto de corte, menor que el ya descrito; si el donante es mayor de 40 años la progresión a fibrosis se ve incrementada en más de 3 veces, esto es a mayor edad del donante la aparición de fibrosis es más temprana. El índice de progresión de fibrosis fue de

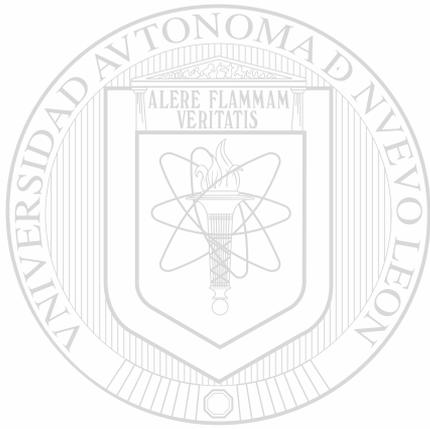
5.71 años cuando la edad del donante era mayor de 40 años y de 17.34 años cuando era menor de 40 años.

La trascendencia de este hallazgo radicaría en que, cuando no puede evitarse el uso de donantes de mayor edad en pacientes portadores de hepatopatía crónica secundaria a VHC, deberá anticiparse que tendrán un curso de hepatitis más agresiva, por lo que a estos pacientes, especialmente, se les debe proponer terapia antiviral postrasplante inmediato. (170)

Aunque había sido previamente descrito por datos de la UNOS, la interacción entre el receptor femenino, la infección por VHC y la evolución del trasplante, y la menor supervivencia del injerto (169), nosotros encontramos una correlación positiva entre el nivel de RNAmTGF $\beta$  y el sexo femenino del receptor, encontrándose mayor expresión del RNAm TGF $\beta$  en el sexo femenino que en el masculino, y sobretodo en los primeros 5 años del trasplante, esto podría sugerirnos, que el sexo del receptor puede tener alguna influencia en la severidad de la recidiva del virus C postrasplante. No encontramos correlación entre el sexo del receptor y el índice de progresión de fibrosis, para lo cuál, se tendría que llevar a cabo un seguimiento a largo plazo para determinar la sobrevida del injerto y del paciente en función del sexo.

En resumen observamos que el TGF $\beta$  tiene influencia sobre la fibrogénesis hepática de la recidiva C postrasplante, sin embargo no es un factor único, lo anterior nos confirma que el proceso de fibrogénesis hepática es multifactorial, por lo cual deberán realizarse estudios para dilucidar otros factores, como por ejemplo las observaciones encontradas en nuestro estudio en cuanto a la edad del

donante y el sexo del receptor que de confirmarse por otros estudios serían un punto importante en la historia natural de la recidiva del virus C en pacientes postrasplante hepático y anticiparíamos que los receptores del sexo femenino y co-donantes mayores de 40 años, tendrían recidiva más severa por lo que podríamos realizar intervenciones terapéuticas tempranas en éstos pacientes.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

El RNAm del factor transformante de crecimiento  $\beta$  se expresa en el tejido hepático de pacientes con hepatitis C antes y después del trasplante, independientemente de cual sea el grado de lesión.

La expresión del RNAmTGF $\beta$  es más intensa cuando mayor sea el grado de fibrosis en pacientes con recidiva C postrasplante, encontrándose una correlación positiva, mientras que en los pacientes no trasplantados con hepatitis crónica C no hubo correlación.

No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión del RNAmTGF $\beta$  en pacientes trasplantados con recidiva C y en pacientes no trasplantados con hepatitis crónica C.

En los pacientes trasplantados con recidiva C, la expresión del RNAmTGF $\beta$  es más intensa en aquellos pacientes con mayor rapidez de progresión de fibrosis.

El índice de progresión a fibrosis en el paciente trasplantado con recidiva C es de 12 años.

El grado de inflamación encontrado en la biopsia hepática no se relaciona con la intensidad de expresión del RNAmTGF $\beta$

La intensidad de la expresión del RNAmTGF $\beta$  no se ve influida por el tipo de inmunosupresor anticalcineurínico usado.

La edad del donante impacta de manera relevante sobre el índice de progresión de la fibrosis, ya que a mayor edad del donante, menor tiempo de desarrollo de cirrosis, siendo la edad mayor de 40 años el punto de corte al cual se acelera la progresión a fibrosis hasta 3 veces más que en los menores de 40 años.

El sexo femenino del receptor se correlaciona a mayor expresión del RNAm TGF $\beta$ .

No se encontró correlación entre el nivel de RNAmTGF $\beta$ , y variables como genotipo, carga viral, ni el nivel de transaminasas.

## CAPITULO VI

### PERSPECTIVAS

Estudiar y descubrir otros factores claves, tanto genéticos, como de respuesta inflamatoria y de fibrogénesis hepática (péptido aminoterminal del procolágeno tipo III , colágeno IV, laminina, tenascina, undulina y ácido hialurónico) así como de colagenólisis (metaloproteinasa MMP-2)) o inhibidores de la metaloproteinasas (TIMP-1 y TIMP-2) que nos permitan realizar intervenciones terapéuticas tempranas pre y postrasplante inmediato para evitar la severidad de la recidiva C y la pérdida del injerto.

El progreso en la regulación molecular de la fibrosis y en su tratamiento, será el futuro en ésta materia. Los avances en terapia génica, al encontrar blancos tisulares específicos, el poder usar moléculas pequeñas como inhibidores de citocinas.

El poder lograr un mejor y mayor conocimiento acerca de la regulación del crecimiento y apoptosis de las células estrelladas.

Y en un futuro el uso de microchips al secuenciar el genoma humano nos permitirá determinar el grado de polimorfismo genético que predice la severidad de la fibrosis y determinar patrones de expresión multigénica para poder realizar intervenciones clínicas y terapéuticas, como sería, la terapia génica dirigida a las células hepática podía usarse para reemplazar un gen perdido, expresar un gen que no se expresa normalmente, interferir con la expresión de un gen, o reparar un gen mutado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Parrilla P. *Perspectiva Histórica de los Trasplantes de Organos. Memorias del curso: Trasplante de órganos células: dimensiones éticas regulatorias.* 15-25. (2001)
2. Keeffe E.B, *Hepatology: A Century of Progress. Liver Transplantation at the Millennium.* Clin Liv Dis .4:242-255. (2000)
3. Moore FD, Birch AG and Dagher F. *Immunouppression and vascular insufficiency in liver trasplantation.* Ann N Acad Sci.102:729. (1964)
4. Starlz TE, Marchioro TL and Von Kaulla KN: *Homotransplantation of liver in humans.* Surgery, Gynecology and Obsterics.117:659. (1963)
5. Kalayouglu M, Sollinger WH and Stratta RJ. *Extended preservation of the liver for clinical transplantation.* Lancet. 1:617. (1988)
6. Starlz TE: *History of liver and other splachnic organ transplantation.* In Busuttill RW, Klintmalm GB (eds): *Transplantation of the Liver.* Philadelphia, WB Saunders. p 3. (1996)
7. Calne RY and Williams R. *Liver trasplantation in man .I. Observations on technique and organization in five cases.* BMJ. 4:535. (1968)
8. Iwatsuki S, Starlz TE and Todds S. *Experience in 1,000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy: A survival report.* Trasplant Proc . 20 (suppl1):498. (1998)
9. Starlz TE, Iwatsuki S and Van Thiel DH: *Evolution of liver transplantation* Hepatology. 2:614. (1982)
10. Starzl TE, Todo S and Fung J. *FK506 for human liver, kidney and pancreas transplantation.* Lancet.2:1000. (1989)
11. Denton M.D, Magee C.C and Sayegh M.H. *Immunosuppressive strategies in transplantation.* Lancet.353:1083-1091. (1999)
12. Harihara Y, Makuuchi M and Kawarasaki H. *Initial experience with living related liver transplantation at the University of Tokyo* Trasplant Proc. 30 :129-131 (1996)
13. Marcos A. *Right lobe living donor liver transplantation: a review.*

Liver Transpl. 6:3-20 (2000)

14. Schiano TD, Schluger LK, Gondeles G and Miller CM. Adult Living Donor Liver Transplantation: The Hepatologist's perspective. *Hepatology*. 33:3-9 (2001)
15. Azoulay D, Astarcioglu I and Bismuth H. Split liver transplantation: The Paul Brousse policy. *Ann Surg*. 224:737-748. (1996)
15. Nagayasu T and Platt JL: Progress in xenotransplantation. *Graft* 1:19. (1998)
17. Mañez R. Xenotrasplantes. Memorias del Curso: Trasplante de órganos y células: dimensiones éticas regulatorias. (2001)
18. Yoshida Y, Tokusashi Y and Ogawa K. Intraesplenic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans cinnamom rats. *Gastroenterology*. 111:1654-1660. (1996)
19. Mito M and Kusano M: Hepatocyte transplantation in man. *Cell Transplantation*. 2:65-74. (1993)
20. Grossman M, Rader DJ and Muller DWM. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nature Med*. 1:1148-1154. (1995)
21. Matesanz R and Miranda B. Organ Donation: "The Spanish Model". *Transplant Proc* 28:11. (1996)
22. Miranda B, Fernández L, Matesanz R. The Potential Organ Donor Pool: International Figures. *Transplant Proc* 29:160-1606 (1997)
23. Manyalich M, Cabrer C, Paredes D. Memorias del curso el nuevo ciclo vital: proceso de donación y trasplante de órganos y tejidos. Santander (2001)
24. Miranda B, Segovia C, Sánchez M, Felipe C, Naya MT and Matesanz R. Evolution of Organ Procurement and Donor Characteristics in Spain. *Transplant Proc*. 27:2384-2388. (1995)
25. López-Navidad A, Domingo Pand Viedma MA. Professional Characteristics of the Transplant Coordinator. *Transplant Proc* 29: 1607-1613 (1997)

26. Devlin J, O'Grady J. Indications for referral and assessment in adult liver transplantation: A clinical guideline. *Gut* 45:7-25. (1999)
27. Baker A, Dhawan A and Heaton N. Who needs a liver transplant?(new disease specific indications). *Arch Dis Child*. 79:460-467. (1998)
28. Poupon RE, Lindor KD, Cauch-Dudek K, Dickson ER, Poupon R and Heathdote EJ. Combined analysis of randomized controlled trial of ursodesoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 113:884-890. (1997)
29. Neuberger J. Transplantation for primary biliary cirrhosis. *Seminar Liver Dis*. 17:137-146. (1997)
30. Sebagh M, Frages O, Dubel L, Samuel D, Bismuth H and Reynes M. Histological features predictive of recurrence of primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *Transplantation* .65:1328-1333. (1998)
31. Dmitrewski J, Hubscher SG, Mayer D and Neuberger JM. Recurrence of primary biliary cirrhosis in the liver allograft: the effect of immunosuppression. *J Hepatol*. 24:253-257. (1996)
32. Weisner RH, Grambsch PM, Dickson ER; Ludwig J, Mac Carty RL, Hunter EB. primary sclerosing cholangitis: Natural history, prognostic factors an survival analysis. *Hepatology* 10:430-436.
33. Martin P. Orthotopic liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Ann Surg*. 25:472-483. (1997)
34. Harrison RF, Davies MH, Neuberger JM and Hubscher SG. Fibrous and obliterative cholangitis in liver allografts: evidence of recurrent primary sclerosing cholangitis?. *Hepatology* 20:356-361. (1994)
35. Rimola A. Indicaciones del Trasplante Hepático. *Cirrosis. S/E. En curso de actualización en Trasplante Hepático* .Capítulo III. España. 35-44. (1998)
36. Vierling JM, Teperman LW and Brownstein AP. Hepatitis B liver transplant symposium . *American Liver Foundation*. (1998)
37. Naoumov NV, Lopes AR, Burra P, Caccamo L, Iemmolo RM, de Mann RA, Basendine M, O'Grady JG, Portmann BC, Anschuetz G, Barrett CA, Williams R, and Atkins M. Randomized trial of lamivudine versus hepatitis immunoglobulin for long-term prophylaxis of

- hepatitis B recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 34:888-894. (2001)
38. Perillo RP, Wright T, Rakela J, Levy G, Schiff E, Gish R, Martin P, Dienstag J, Adams P, Dickson R, Anschuetz G, Bell S, Conreay L, Brown N and the lamivudine North America trasplant group. *Hepatology* 33:424 - 432. (2001)
  39. Sánchez-Fueyo A, Rimola A, Grande L, Costa J, Mas A, Navasa M, Cirera I, Sánchez-tapias JM and Rodes J. Hepatitis B Immunoglobulin discontinuation followed by hepatitis B virus vaccination: a new strategy in the prophylaxis of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 31:496-500. (2000)
  40. Hoofnagle JH, Kresina T, Fuller RK, Lake JR, Lucey MR, Sorrell MF. Liver trasplantation for alcoholic liver disease: Executive statement and recommendations. Summary of a National Institutes of Health workshop. December 6-7. Bethesda, Maryland. *Liver Transpl Surg* 3:347-350. (1997)
  41. Pereira SP and Williams R. Liver Trasplantation for alcoholic liver disease at King's College Hospital: Survival and quality of live. *Liver Transpl Surg* 3:245-250. (1997)
  42. Czaja A J. Diagnosis and therapy of autoimmune liver disease. *Med Clin North Am* 80:973-94 (1996)
- 
43. Ahmed M, Multimer D, Hathaway M, Hubscher S, Mac Master P and Elias E. Liver trasplantation for autoimmune hepatitis: A 12 years- experience. *Transplant Proc.* 29: 496. (1997)
  44. O'Grady JG. Recurrence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis and autimmune chronic hepatitis after liver transplantation: Fact or Fancy ? *Liver Transpl* 25:281-285.
  45. Kintmalam G, Ramanan J and Jennings L. International registry of hepatic tumors in liver transplantation. Current treatments and overall results. XVI International Congress of the Transplantaton Society. Book of abstracts 102, Barcelona (1996)
  46. Busuttill RW and Farmer DG. The surgical treatment of primary hepatobiliar malignancy. *Liver Transpl Surg* 2:114-130. (1996)
  47. Otto G, Heuschen U, Hoffman WJ, Krumm G, Hinz U and Herfarth C. survival and recurrence after liver transplantation versus liver resection for hepatocellular carcinoma. A retrospective

analysis. *Ann Surg* 277:424- 432. (1998)

48. Vilana R, Bruix J, Bru C, Ayuso MC, Solá M and Rodés J. Tumor size determines the efficacy of percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* .16: 353:357. (1992)
49. Castells A, Bruix J, Bru C, Montayá X, Boix L and Rodés J. Transarterial embolization for hepatocellular carcinoma. Antibiotic prophylaxis and clinical meaning of postembolization fever. *J Hepatol*. 22:410-415. (1995)
50. Penn I. Hepatic Transplantation for primary and metastatic cancer of the liver. *Surgery* .110:726-735. (1991)
51. Mazzaferro, Regalia E, Docio V, Andreola S, Pulvirenti A and Brozzetti F. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334:693 (1996)
52. William M. Lee and Roger Williams . Acute Liver failure. Part 4th. *EUA*. Cambridge University Press 173-222. (1997)
53. Arroyo V, Bosch J, Bruix J, Ginés P, Navasa M and Rodés J. Therapy in Hepatology. Barcelona *Ars Medica* (2001)
54. Poulos JE, Bacon RR. Liver transplantation for hereditary hemochromatosis. *Dig Dis Sci*. 14:316-32. (1996)
55. Schilsky ML, Scheinberg IH and Sternlieb I. Liver transplantation for Wilson's disease: Indications and outcome. *Hepatology*. 19:583-587. (1994)
56. McDermont WV, Stone MO, Bohte A and Trey C. Budd-Chiari syndrome. Historical and clinical review with an analysis of surgical corrective procedures. *Am J Surg*. 147:463-467. (1984)
57. Bearman SI. The syndrome of hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. *Blood* .85:3005-3020. (1995)
58. Ringe B, Lang H, Oldhafer KJ, Gebel M and Flemming P. Which is the best surgery for Budd-Chiari syndrome: venous decompression or liver transplantation? A single center experience with 50 patients. *Hepatology*. 21:1337-1344. (1995)
59. Consenso Español para los Grupos de Trasplante Hepático (Asociación

**Española para el estudio del hígado) Indicaciones y  
contraindicaciones de Trasplante. España, 2001**

- 60. Berenguer J, Parilla P. Trasplante Hepático. Madrid: Editorial Elba S.A, S/E (1999)**
- 61. Lange PA, Stoller JK, The hepatopulmonary syndrome. Effect of liver transplantation. Clin Chest Med. 17:115-123. (1996)**
- 62. Ramsay MA, Simpson BR, Nguyen AT, Ramsay KJ, East C and Klintmalm GB. Severe pulmonary hypertension in liver transplant candidates. Liver Transpl Surg. 3:494-500. (1997)**
- 63. Penn I. Evaluation of the candidate with a previous malignancy. Liver Transpl Surg 2:109-113. (1997)**
- 64. Carithers R. L. Liver Transplantation. AASLD Practice Guidelines. Liver Transpl 6:122-135. (2000)**
- 65. Organización Nacional de Trasplantes (ONT)  
(<http://w.w.w.msc.es/ont/home.htm>)**
- 66. UNOS Scientific Registry Data September 15, 1997  
(<http://w.w.w.unos.org/>).**
- 67. Pierce GA, Graham HM, Kauffman Jr, Wolf J.S. and The United Network for Organ Sharing. 1984 to 1994. Transplant Proc 28: 12-15. (1996)**
- 68. Liver transplantation listing criteria. United Network for Organ Sharing (UNOS), January 1998**
- 69. Hutchinson I. Mode of action of immunosuppressive agents. Round Table Series. Royal Society of Medicine 49:25-32. (1997)**
- 70. Borel JF, Feurer C, Guber HU and Tahelin H. Biological effects of Cyclosporine A. a new antilymphocyte agent. Agents actions. 468-475. (1976)**
- 71. Calne RY, White DJG, et al: Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. Lancet 2:1033. (1979)**
- 72. Iwatsuki S, Starzl TE, Todd S, et al. Experience in 1,000 liver transplants**

under cyclosporine-steroid therapy: A survival report. *Transplant Proc* 20(suppl1):498 (1988)

73. Denton MD, Magge CC, Sayegh MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 353:1083-1091. (1999)
74. Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 multicentre liver Study Group. *Lancet* 344:423 (1994)
75. A Comparison of Tacrolimus (FK 506) and Cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. *N Engl J Med.* 331:1110-1114 (1994)
76. Bennett WM, Burdman EA and Andoh TF. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* ;9 (suppl,4).141-145. (1994)
77. Fennell RH. The toxic effect of immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 5(suppl 4):149-151 (1986)
78. Lipsky JJ. Mycophenolate mofetil. *Lancet.* 348:1357-1359. (1996)
79. Kahan BD. The Role of Rapamycin in Chronic Rejection Prophylaxis: A Theoretical Consideration. *Graft* 2(suppl II):93-96. (1998)
80. Groth CG, Backman L, Morales JM, Calne R, Kreis H, Lang P, Touraine JL, Claesson K, Campistol JM, Durand D, Wramner L, Brattstrom C, and Charpentier B. Sirolimus (Rapamycin)-based therapy in human renal transplantation. *Transplantation* .67:1036-1042 (1999)
81. Kreis H, Cisterne JM, Land W, Wramner L, Squifflet JP, Abramowicz D, Campistol JM, Grinyo JM, Mourad G, Berthoux FC, Brattstrom C, Lebranchu Y, and Vialtel P. Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* . 69:1252-1260 (2000)
82. Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, and Neylan J, for the rapamune study group. Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in Caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial. *Transplantation* 6:1526-1532. (1999)

83. Eckhoff DE, McGuire B, Sellers, Contreras J, frenette L, Young C, Hudson S and Bynon JS. The Safety and Efficacy of a two -dose Daclizumab (Zenapax) induction therapy in liver transplant recipients. *Transplantation* 69:1867-1872
84. Safadi R, and Friedman SL. Hepatic Fibrosis. Role of Hepatic Stellate Cell Activation. *Medscape Gastroenterology e Journal* 4:4 (2002)
85. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R and Hahn EG. Matrix as modulator of modulator of stellate cell and hepatic fibrogenesis. *Seminar Liver Dis.* 21:351-372. (2001)
86. Iredale JP, FRCP, Liver Research Group. Hepatic Stellate Cell Behavior during resolution of Liver Injury. *Seminar Liver Dis.* 21.427-436. (2001)
87. Friedman SL. The cellular basis of hepatic Fibrosis: Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* .328:1828-1835. (1993)
88. Solís-Herruzo JA. Factores Involucrados en la Fibrogénesis Hepática. *Gastroenterol Hepatol* 23:186-199 (2000)
89. Franklin J: Therapeutic approaches to organ fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* .29:79-89. (1997)
- 
90. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis and integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 275:2247-2250. (2000)
91. Jonsson JR, Ando Y, Keleman L, Clouston AD and Powell EE. Angiotensin Converting enzyme inhibition attenuates the development of hepatic fibrosis in the rat bile duct ligation model. *Hepatology* 32:191 A. (2000)
92. Epstein FH, Border WA and Noble NA. Trasforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 331:1286-1292. (1994)
93. Derynck R, Jarrett A, Chen JE, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB and Goeddel DV. Human transforming growth factor  $-\beta$  complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316:701-705. (1985)
94. Epstein FH, Blobel GC, Schiemann WP and Lodish HF. Role of

Transforming growth factor  $\beta$  in Human Disease. *N Engl J Med.* 342:1350-1358. (2000)

95. Prashar Y, Khanna A, Sehajpa P, Sharma VK and Suthanthrian MI. Stimulation of transforming growth factor  $-\beta$  1 transcription by cyclosporine. *FEBS Lett* 358:109-112. (1995)
96. Ahuja SS, Shirataus S, Danielpour D, Balow JE and Boumpas DT. Regulation of transforming growth factor  $-\beta$  1 and its receptor by cyclosporine in human T lymphocytes. *Transplantation* 60:718-23. (1995)
97. Waltenberg J, Miyazono K, Funa A, Wanders A, and Heldin CH. Transforming Growth Factor  $\beta$  and Organ transplantation. *Transplant Proc* 25:2038-40. (1993)
98. Czaja BI, Weiner FR, Flanders KC, Giamborne MA, Wind R, Biempica L and Zem MA. In vitro and in vivo association of transforming growth factor  $\beta$  1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 108:2477-82. (1989)
99. Nakatsukasa H, Nagy P and Everts RP. Cellular distribution of transforming growth factor- $\beta$ , and procollagen types I, III, IV transcripts in carbon tetrachloride - induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 85:1833- 43. (1990)
- 
100. Castilla A, Prieto J and Fausto N. Transforming growth factors  $\beta$  1 and  $\beta$  2 in chronic liver diseases. *N Engl J Med.* 324 :933-934 (1991)
101. Jakowlew SB, Mead JE, Danielpour D, Wu J, Roberts AB and Fausto N. Transforming growth factor-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) isoforms in rat liver regeneration: messenger RNA expression and activation of latent TGF- $\beta$ . *Cell Regulation.* 2:535-548. (1991)
102. Armendariz-Borunda J, Seyer JM, Kang AH and Raghov R. Regulation of TGF $\beta$  gene expression in rat liver intoxicated with carbon tetrachloride. *The FASEB J.* 4:215-221. (1991)
103. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, and Stern DF. Type  $\beta$  transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:119-123. (1985)
104. Bisell DM, Wang SS, Jarnagin WR and Rolf J. Cell-specific expression of

Transforming Growth Factor- $\beta$  in Rat Liver. Clin Invest.96:447-455. (1995)

105. Penttinen RP, Kobayashi S and Bornstein P. Transforming growth factor  $\beta$  increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. Proc Natl. Acad Sci USA.85:1105-1108. (1988)
106. Cheifetz S, Bassols A, Stanley K, Ohta M, Greenberg J and Massagué J. Heterodimeric transforming growth factor  $\beta$ . J. Biol. Chem. 263:10783-10789. (1988)
107. Branton MH and Kopp JB. TGF- $\beta$  and fibrosis. Microbes Infect (France) 15:1349-1365. (1999)
108. Little DM, Haynes LD, Alam T, DoeGeraghty JG, Sollinger HW and Hullett DA. Does transforming growth factor  $\beta$ 1 play a role in the pathogenesis of chronic allograft rejection?. Transpl Int. 12:393-401. (1999)
109. Hutchinson IV, Turner DM, et al. Influence of Cytokine genotypes on allograft rejection. Transplant Proc 30:862-863 (1998)
110. Hutchinson IV. The Role of Transforming Growth Factor- $\beta$  in Transplant rejection. Transplant Proc 31(Suppl 7A),9S-13S. (1999)
111. Bathgate AJ, Pravica V, Perrey C, Therapondos G, Plevris JN, Hayes PC and Hutchinson IV. The Effect of Polymorphism in Tumor Necrosis Factor- $\beta$ , Interleukin-10 and transforming Growth factor- $\beta$ 1 genes in Acute Hepatic Allograft Rejection. Transplantation, 69:1514-1517. (2000)
112. Massagué J. The TGF- $\beta$  Family of Growth and Differentiation Factors. Cell.49:437-438. (1987)
113. Demirici G, Hoshino K and Nashan B. Expression patterns of integrin receptors and extracellular matrix proteins in chronic rejection of human liver allografts. Transpl Immunol. 7: 229-237. (1999)
114. Qui T, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A and Ueno H. Blockade of type  $\beta$  transforming growth factor signalling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. Proc Nat Acad Sci USA.96:2345-2349. (1999)
115. Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M and Ueno H. Inhibition of Transforming Growth Factor  $\beta$  prevents progression of Liver

Fibrosis and Enhances Hepatocyte regeneration in Dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology*.32:247-255. (2000)

116. Khanna A, Radhakrishna V, Suthanthrian M. Stimulation of TGF- $\beta$  expression by FK-506 (tacrolimus). *J Heart Lung Trasplant* 16: 255. (1997)
117. Muller AR, Platz KP, Berg T, et al. Long-term follow-up in hepatitis C patients with respect to immunosuppression. *Trasplant Proc*. 28: 3241-2. (1996)
118. Hutchinson IV. The mode of action of Prograf (tracolumus) and its significance for long-term graft survival. *New Horiz Kid Trasplant* 1: 22-6. (1997)
119. Chen YG, Liu F and Massagué J. Mechanism of TGF $\beta$  receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* .1: 3866-76. (1997)
120. Okadome T, Oeda E, Saitoh M, Ichijo H, Moses HL, Miyazono K and Kawabatas M. Characterization of the Interaction of FKBP12 with the Trasforming Growth Factor- $\beta$  Type I receptor in Vivo\*. *Journ Bio Chem* .271:21687-90. (1996)
121. Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T and Donahoe PK. The immunophilin FKBP12 Functions As a common inhibitor of the TGF $\beta$  Family Type I Receptors. *Cell* 86:435-44. (1996)
122. Zhang JG, Walmsley MW, Moy JV, Cunningham AC, Talbot D, Dark JH and Kirby JA. Differential effects of cyclosporin A and Tacrolimus on the production of TGF- $\beta$ : implications for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Traspl Int* .11(Suppl1):S325-S327 (1998)
123. Chang MJ, Kinnunen P, Hawkers J, Brand T and Schneider MD. FKBP-12 recognition is dispensable for signal generation by type I trasforming growth factor- $\beta$  receptors\*. *The Journ Bio Chem* .271:22941-44 (1996).
124. Mohamed MAS, Walmsley M, Robertson H, Kirby JA and Talbot D. The Effect of Cyclosporine A and Tacrolimus on cultured Human Epithelial Cells: The Role of TGF- $\beta$  *Trasplant Proc* 31:1173. (1999)

125. Mohamed MAS, Robertson H, Booth T, Balupuri S, Kirby JA, Talbot D. TGF- $\beta$  Expression in renal trasplant biopsies. *Trasplantation*. 69:1002-1005. (2000)
126. Khanna A, Li B, Stenzel KH and Suthanthiran M. Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine. *Transplantation*. 57: 577-81. (1994)
127. Nabel G.A transformed view of cyclosporine. *Nature*.397:471-472. (1999)
128. Cuhaci B, Kumar MSA, Bloom RD, Pratt B, Hausman G, Laskow DA, Alidoost M, grotkowski C, Cahill K, Butani L, Strugill BC and Pankewycz OG. Trasforming growth factor  $\beta$  levels in human allograft chronic fibrosis correlate with rate of decline in renal function. *Trasplantation* .68:785-790. (1999)
129. Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, Petros WP, Pharm D and Jirtle RL..Trasforming Growth Factor  $\beta$  as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med* .328:1592-1598. (1993)
130. Jain S, Fumess PN and Nicholson ML. The Role of transforming Growth factor beta in chronic renal allograft nephropathy. *Trasplantation* 69:17509-1766 . (2000)
131. Inigo PJ, Campistol JM, Lario S ,Bescos M, Rivera F and Oppenheimer F. Relationship between TGF- $\beta$ 1 plasma levels and immunosuppressive therapy in Renal Trasplant recipients. *Journ American society Nephrology* 10 (Abstracts). 758A-759a, a3836 (1999)
132. Coupes BM, Williams S, Roberts ISD, Short CD, Jhonson RWG and Brenchley PEC. Differential expression of TGF $\beta$  during Immunosuppression with Tacrolimus and Cyclosporine A (CsA) in Human Renal Allograft Recipients. *J Am Soc Nephrol* : 725A, abst.A3668. (1999)
133. Mohamed MAS, Burt AD, Robertson H, Kirby JA and Talbot D. TGF- $\beta$  expression in protocol trasplant biopsies: A comparative study between Cyclosporine-A (CyA) and Tacrolimus (FK-506) Immunosuppression. *Transplant Proc* 33:1378-1380. (2001)

134. Marco M, Schouten J, Treatment Action Group (TAG). The Hepatitis Report. Version 1.0. July 2000
135. Alter MJ, Kruszon-Moran D and McQuillan GM: Prevalence of Hepatitis C virus infection in the United States (letter). *N Engl J Med* 341:2095. (1999)
136. Alter MJ, Kruszon-Moran D and Nainan OV. The prevalence of the Hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 341:556-562. (1999)
137. Arthur RR, Hassan NF and Abdallah MY. Hepatitis C antibody prevalence in blood donors in different governorates in Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:271-274. (1997)
138. Choo QL, Kuo G and Weiner AJ. Isolation of cDNA cloned derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362. (1989)
139. Forns X and Bukh J. The molecular Biology of Hepatitis C virus. *Clinics in Liver Disease*. 3:1-23 (1999)
140. Draza KE. *Molecular Biology of Hepatitis C infection*. *Liver Transpl* 6:396-406. (2000)
141. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 122:1554-1568. (2002)
- 
142. Aach RD, Stevens CE and Hollinger BF. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first and second assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-1329 (1991)
143. Mc Hutchinson JG; Person JL and Govindarajan S. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk populations. *Hepatology* .15:19-25. (1992)
144. Ghany MG, Chan TM and Sánchez-Pescador R. Correlation between serum HCV RNA and aminotransferase levels in patients with chronic HCV infection. *Dig Dis Sci* 41:2213-8. (1996)
145. Muñoz LE. Diagnóstico de la infección por virus C. Consenso Nacional sobre Hepatitis C. Junio 28-29, San Miguel de Allende, Gto, Mex. 29-37. (2002)
146. Poynard T, Bedossa P and Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 349:825-32. (1997)

147. De Moliner L, Pontisso P and De Salvo GL. Serum and liver HCV RNA levels in patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and histological features. *Gut* 42:856-860. (1998)
148. Prieto M, Berenguer M, Rimola A, Loinaz C, Barrios C and Clemente G. Liver transplantation in hepatitis C. A Spanish multi-center experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10: 771-776. (1998)
149. Araya V, Rakela J, Wright T. Hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology*. 112: 575-82. (1997)
150. Fukumoto T, Berg T, Ku Y, Bechstein WO, Knoop M, Lemmens HP, Lobreck H, Hopf U and Nehaus P. Viral dynamics of hepatitis C Early after orthotopic liver transplantation: evidence for rapid turnover of serum virions. *Hepatology*. 24 : 1351-54. (1996)
151. Forns X, Garcia M, Feliu A, retortillo MG, Moutinho E, costa J, Mas A, Grande L, Navasa M and rodés J. Hepatitis C virus (HCV) kinetics and quasispecies evolution during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 34:362A. (2001)
152. Féray C, Gigou M, Samuel D, Paradise V, Wilberg J, David MF, Urdea M, Reynes M, Brechot C and Bismuth H. The Course of Hepatitis C Virus Infection after Liver Transplantation. *Hepatology*. 20:1137-1143. (1994)
- 
153. Gane EJ, Portmann BC, Naoumou NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, Maertens G and Williams R. Long-Term outcome of Hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med*. 334:815-820. (1996)
154. Boker KH, Dalley G, Bahr MJ, Maschek H, Tillmann HL, Trautwein C, Oldhaver K, Bode U, Pichlmayr and Manns MP. Long-Term outcome of Hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology*. 25:203-210. (1997)
155. Prieto M, Berenguer M, Rayon JM, Cordoba J, Arguello L and Carrasco D. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology* 29:250-256. (1999)
156. Féray C., Caccamo L, Alexander GJM, Ducot B, Gugenheim J, Casnovas T, Loinaz C, Gigou M, Burra P, Barkholt L, Estefan R, Bizollon T, Lerut J, Franza AM, Bernard PH, Nachbaur K, Bismuth H, Schalm SW and Samuel D. European Collaborative Study on factors influencing outcome after liver transplantation

for hepatitis C. *Gastroenterology*.117:619-625. (1999)

157. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, prieto M, Kim M, Rayon M, Cordoba J, Herola A, Ascher N, Mir J, Berenguer J, and Wright T. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol*.32:673-684. (2000)
158. Testa G, Crppin JS, Netto GJ, Goldstein RM, Jennings LW and Brkic BS. Liver Transplantation for Hepatitis C: recurrence and disease progression in 300 patients. *Liver Transpl* .6:553-561. (2000)
159. Sánchez-Fueyo A, Restrepo JC, Lorenc Q, Bruguera M, Grande L, Sánchez Tapias JM, Rodés J and Rimola A. Impact of the recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation on the long-term viability of the graft. *Transplantation*.73:56-63. (2002)
160. Gane EJ, Naoumov UN, Qian KP, Mondelli MU, Maertens G, Portmann BC, Lau J and Williams R. A Longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology* .110: 167-77. (1996)
161. Rimola A, Restrepo JC and Sánchez-Tapias JM. Incidence and predictive factors of severe HCV recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 1998; 28(suppl.1): 42.
- 
162. Gane EJ, Portamann BC, Naumou NV, et al. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver trasplanatation. *N Engl J Med*. 334: 815-20. (1996)
163. Shuhart MC, Bronner MP, Gretch DR, et al. Histological and clinical outcome after liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 26; 1646-52. (1997)
164. Wright T, Donegan E, Hsu H, Ferrell L, Lake JR and kim M. Recurrent and Acquired hepatitis C viral infection in liver trasplant recipients. *Hepatology*.16:865-876. (1992)
165. Samuel D and Feray C. Recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *J Hepatol*.31(suppl 1):217-221. (1999)
166. Berenguer M, López -Labrtador FX and Wright T. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol*. 35:666-678. (2001)
167. Di Martino v, Brenot C, Samuel D, Saurini F, Paradis V, and Reynés M. influence of liver hepatitis C virus RNA and hepatitis C virus

genotype on Fas-mediated apoptosis after liver transplantation for hepatitis C. *transplantation*.70:1390-1396. (2000)

- 168.** Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, Everhart J, Zetterman R, Lake J, Detre K and Hoofnagle J. Predictors of patients and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* .28.823-830. (1998)
- 169.** Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, and Lucey MR. The Interaction of recipient gender and hepatitis C infection on patients and allograft survival after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* .34:244 A. (2001)
- 170.** Multimer D. Liver donor age influences graft outcome following transplantation for hepatitis C. *Gut*.51:248-252. (2002)
- 171.** Baron PW, Sindram D, Higdon D, Howell DN, Gottfried MR, Tuttle-Newhall Jc and Clavien PA. Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *liver transpl* .6:407-412. (2000)
- 172.** Prieto M, Nicolás D, Rayón JM, Berenguer M, Carrasco D, Mir J, and Berenguer J. Donor-recipient HLA matching does not predict accelerated progression of hepatitis C following liver transplantation in genotype 1b infection. *Hepatology* .32:261. (2000)
- 173.** Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E, et al. Severe and Multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 21.30-34. (1995)
- 174.** Chirwing JM, Przybyla AE and Mac Donald RJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources rich in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.
- 175.** Braun DC. Preparation of Total RNA by Cesium Chloride Centrifugation. *Molecular Biology protocols: purification of total RNA*. (2001)
- 176.** Auboeuf D, Vidal H., et al. The use of the reverse transcription – competitive polymerase Chain reaction to investigate the in vivo regulation of gene expression in small tissue samples. *Anal Biochem* 245:141-148. (1997)
- 177.** Martorana AM, Zheng G, Springall F, et al. Absolute quantitation of specific mRNAs in cell and tissue samples by comparative PCR. *BioTechniques* 27:136-144. (1999)

178. Dallman MJ, Porter ACG. Semi-quantitative PCR for the analysis of gene expression.
179. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* .13: 372-374. (1991)
180. Scheuer PJ. Chronic Hepatitis : What is activity and how should it be assessed?. *Hepatology* 30:103-105 . (1997)
181. Desmet J. *J Hepatol* 19:1513-1520. (1994)
182. Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, et al. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 28:823-830. (1998)
183. Gane E, Naoumov NV, Qian KP, et al. A Longitudinal Analysis of Hepatitis C virus replication following Liver transplantation. *Gastroenterology*.110:167-177. (1996)
184. Samuel D, Feray C. Recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *J Hepatol* 31: (suppl1):217-221. (1999)
185. Ahmed A, Keefe EB. Hepatitis C virus and Liver Transplantation. *Clin Liv Dis* 5:1-18. (2001)
186. Everson GT. Advances and controversies in Liver Transplantation. Posttransplantation Prevention and treatment of Recurrent Hepatitis. *Liver Transpl* 6:S35-S40. (2000)
187. Ballardì G, De Raffeì E, Groff P, et al. Timing of reinfection and mechanism of hepatocellular damage in transplanted hepatitis C virus-reinfected liver. *Liver Transpl* 8:10-20. (2002)
188. Brambilla S, Bellati S, Asti M, et al. Dynamics of hypervariable region 1 variation in Hepatitis C virus infectio and correlation with clinical and virological fatures of liver disease. *Hepatology* 27:1678-1686. (1998)
189. Gretch DR, Polyak SJ, Wilson JJ, et al. Tracking Hepatitis C virus quacispecies major and minor variants in syntomatic and asymptomatic liver transplant recipients. *J. Virol.* 70:7622-7631. (1996)
190. Sánchez-Fueyo A, Jiménez Barcons M, Rimola A, et al. Influence of the dynamics of the hypervariable region 1 of the Hepatitis C virus (HCV) on the histological severity of HCV recurrence after liver

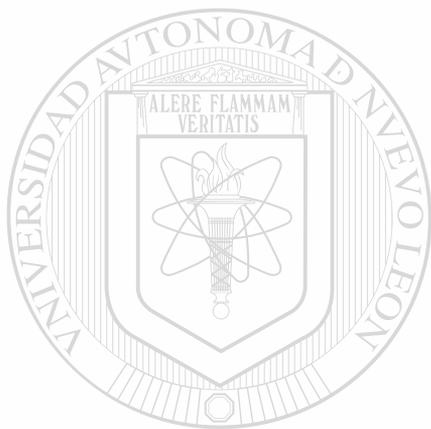
- transplantation. *J Virol* 9999:1-10. (2001)
191. Belli SL, Zavaglia C, Battista A, et al. influence of Immunogenetic background on the outcome of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 31:1345-1350. (2000)
  192. Nagy P, Schaff Z and Lapis K. Immunohistochemical detection of transforming growth factor- $\beta$  1 in fibrotic liver disease. *Hepatology*.14:269-273. (1991)
  193. Yoshioka K, Takekuma T and Murakami K. Transforming growth factor  $\beta$  protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest*.68:154-163. (1993)
  194. Yamamoto T, Nakamura T and Noble NA. Expression of transforming growth factor  $\beta$  is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*.90:1814-1818. (1993)
  195. Shihab F, Yamamoto T and Nast C. Acute and chronic allograft rejection in the human kidney correlate with the expression of the TGF- $\beta$  and extracellular matrix proteins. *J Am Soc Nephrol* .4:671.abstract (1993)
  196. Deguchi Y. Spontaneous increase of transforming growth factor  $\beta$  production by bronchoalveolar mononuclear cells of patients with systemic autoimmune diseases affecting the lung. *Ann Rheum Dis* .51:362-365. (1992)
  197. Kulozik M, Hogg A and Lankat-Buttgereit. Localization of transforming growth factor  $\beta$ 2 with a 1(I)procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest*.86:917-922. (1990)
  198. Peltonen J, Hsiao LL and Jakkola S. Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI of collagen and transforming growth factor  $\beta$  1 mRNA. *J Invest Dermatol* 97:240-248. (1991).
  199. Gahahary A, Shen YJ, Scott PG. Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor  $\beta$  type I, and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissue. *J Lab Clin Med* .122:465-473. (1993)
  200. Varga J, Uitto J and Jimenez SA. The cause and pathogenesis of eosinophilia-myalgia syndrome. *Ann Intern Med*.116:140-147. (1992)

201. Nikol S, Isner JM and Pickering JG. Expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 is increased in human vascular restenosis lesion. *J Clin Invest.* 90:1582-1592. (1992)
202. Connor TB Jr, Roberts AB and Sporn MB. Correlation of fibrosis and transforming growth factor beta type 2 levels in the eye. *J Clin Invest.* 83:1661-1666. (1989)
203. Lafayatis R, Thompson NL and Remmers EF. Transforming growth factor  $\beta$  production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats: studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *J Immunol* 143:1142-1148. (1989)
204. Grainger DJ, Mosedale DE and Metcalfe JC. Active and acid activable TGF $\beta$  in human sera, platelets and plasma. *Clin Chim Acta.* 235:11. (1995)
205. Hughes JR, Hughes VF and Trull AK. Analyses & Commentaries . *Trasplantation.* 68:468-472. (1999)
206. Dallman J and Porter ACG. Semiquantitative PCR for analysis of gene expression . *Biochemistry* 13:3606. (1989)
207. Sambrook J, Fritsch EF and maniatitis T. *Molecular cloning: A laboratory Manual* , 2<sup>nd</sup> ed pp 7.19. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



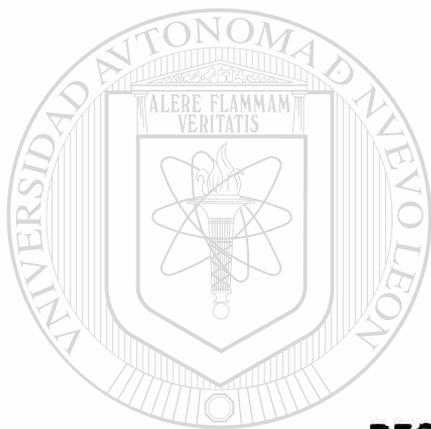
**APENDICES**  
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





UANL

**APENDICE A**

**DECLARACION DE HELSINKI**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial: Recomendaciones para orientar a los médicos en los trabajos de investigación biomédica con sujetos humanos.**

Adoptada por la 18a Asamblea Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, junio de 1964), revisada por la 29a Asamblea Médica Mundial (Tokio, Japón en 1975), en Venecia, Italia en 1983, en Hong Kong en 1989 y a 48 Asamblea General en Somerset West, República de Sudáfrica, 1996.

## **Introducción**

El médico tiene por misión la protección de la salud de la población. Su conocimiento y conciencia están completamente dedicados a esta función.

En su Declaración de Ginebra, la Asociación Médica Mundial constriñe al médico con las palabras "La salud de mi paciente será mi primera consideración" y el Código Internacional de Deontología Médica declara que "el médico ha de actuar sólo en interés del paciente cuando adopte cualquier medida que pueda debilitar su condición física o mental"

La finalidad de la investigación biomédica con sujetos humanos debe ser el perfeccionamiento de los métodos diagnósticos, terapéuticos y profilácticos y el conocimiento de la etiología y la patogenia de la enfermedad

En la práctica médica actual, la mayoría de los métodos diagnósticos, terapéuticos y profilácticos entrañan riesgos. Esto afecta especialmente a la investigación biomédica

El progreso de la medicina requiere investigaciones que en último término deben basarse en la experimentación en el hombre.

En el terreno de la investigación biomédica, conviene establecer una distinción fundamental entre la investigación médica efectuada en un paciente con fines esencialmente diagnósticos o terapéuticos y aquella cuya finalidad esencial es puramente científica y no posee ningún *valor* diagnóstico o terapéutico directo para el sujeto.

La ejecución de investigaciones susceptibles de afectar al medio ambiente requiere especial precaución; por otra parte, se respetará siempre el bienestar de los animales empleados en la investigación.

En atención a que, para el progreso de la ciencia y para el bienestar de la humanidad doliente, se ha hecho indispensable aplicar al hombre los resultados de las experiencias de laboratorio para obtener más conocimiento científico, y para ayudar a la humanidad doliente, la Asociación Médica Mundial ha formulado las recomendaciones que siguen con objeto de que sirvan de norma a todos los médicos que realicen trabajos de investigación biomédica con seres humanos. Estas recomendaciones serán objeto de revisión en el futuro. Es importante poner en relieve que las normas que figuran en este cuerpo doctrinal no se proponen otra finalidad que servir de guía a los médicos de todo el mundo. Nada exime al médico de su responsabilidad penal, civil y ética con respecto a las leyes de sus propios países.

## **Principios fundamentales**

Los trabajos de investigación biomédica con sujetos humanos deberán ajustarse a los principios científicos generalmente reconocidos y basarse en pruebas de laboratorio y ensayos en animales practicados como es debido, así como un conocimiento profundo de la literatura científica.

El plan y la implementación de todo método de experimentación en sujetos humanos deberán formularse claramente en un protocolo de experimentación que se transmitirá, para ser examinado, comentado y enjuiciado, a un comité constituido al efecto, independiente del investigador y del promotor. Se sobreentiende que este comité independiente se atiene a las leyes y regulaciones del país en que se realiza la investigación.

Todo trabajo de investigación biomédica con sujetos humanos ha de estar sólo a cargo de personas que posean la debida preparación científica y bajo vigilancia de un profesional de la medicina con la necesaria competencia clínica. La responsabilidad sobre el ser humano objeto de un experimento debe recaer siempre en una persona capacitada médicamente y jamás en el propio sujeto de la investigación, ni siquiera aunque éste haya dado su consentimiento

Sólo será lícito llevar a cabo trabajos de investigación biomédica con sujetos humanos si el objetivo propuesto justifica el inherente riesgo a que se expone el paciente.

Antes de emprender un trabajo de investigación biomédica con sujetos humanos, habrá que sopesar con el mayor esmero los riesgos previsibles y las ventajas que cabe esperar para el individuo objeto de la experiencia o para otras personas cualesquiera. En todo caso, el interés del sujeto debe prevalecer por encima de los intereses de la ciencia y de la sociedad.

Debe respetarse siempre el derecho de cada individuo participante en la investigación a salvaguardar su integridad personal. Habrán de adoptarse todas las precauciones necesarias para respetar la intimidad del sujeto y para reducir al mínimo las repercusiones del estudio sobre la integridad física y mental del sujeto y sobre su personalidad.

Los médicos deberán abstenerse de participar en proyectos de investigación que requieran la participación de sujetos humanos a menos que tengan el convencimiento de que los riesgos inherentes se consideran predecibles. En todo caso, deberán interrumpir la investigación si se comprueba que los riesgos superan a las posibles ventajas.

En la publicación de los resultados de sus investigaciones, el médico deberá respetar siempre la exactitud de los resultados. Los informes sobre experimentos cuya práctica no se haya ajustado a los principios expuestos en la presente Declaración no deberán aceptarse para su publicación.

En todo trabajo de investigación sobre seres humanos, se informará debidamente al posible sujeto de los objetivos, los métodos, las ventajas previstas y los posibles riesgos inherentes al estudio así como de las incomodidades que éste pueda acarrear. Habrá de informarse al sujeto de que, si lo desea, puede abstenerse de participar en el estudio y de que es libre de retirar su consentimiento de participación en cualquier momento. El médico deberá obtener, a ser posible por escrito, el consentimiento del sujeto, libremente otorgada.

En la obtención del consentimiento informado para el proyecto de investigación, el médico habrá de obrar con particular precaución si el sujeto se encuentra en una relación de dependencia respecto de él o puede consentir por coacción. En ese caso deberá obtener el consentimiento del paciente ya informado un médico que no participe en la investigación y que sea independiente por completo de esa relación oficial.

En caso de incapacidad legal del paciente, se solicitará la autorización de su tutor o representante legal, de conformidad con la legislación nacional. En caso de incapacidad física o mental que hiciere imposible obtener el consentimiento, o cuando el sujeto sea menor, el permiso del pariente responsable suplirá al del enfermo, de conformidad con la legislación nacional. Siempre que el menor sea capaz de dar su consentimiento, habrá de obtenerse éste además de la autorización de su tutor legal.

En el protocolo de la investigación figurará siempre una declaración sobre las consideraciones éticas inherentes al caso y se indicará que se han tenido en cuenta los principios enunciados en la presente Declaración.

#### **Investigación médica asociada a la asistencia profesional (investigación clínica).**

En el curso del tratamiento de un enfermo, el médico debe estar en libertad de recurrir a una nueva medida diagnóstica o terapéutica si, a su juicio, ésta ofrece fundadas esperanzas de salvar la vida, de restablecer la salud o de aliviar el dolor del paciente.

Habrán de sopesarse los potenciales beneficios, los riesgos y las molestias que puede reportar todo nuevo método en comparación con las ventajas de los mejores métodos diagnósticos y terapéuticos actualmente en uso.

En cualquier estudio médico deberá aplicarse a todos los pacientes -incluidos los del grupo o grupos de control, si los hubiere- el método diagnóstico o terapéutico de mayor eficacia comprobada.

La negativa del paciente a participar en un estudio jamás deberá afectar la relación médico-enfermo.

Si el médico estimara indispensable no obtener el consentimiento del sujeto informado, deberá exponer las razones concretas de ello en el protocolo experimental que examinará el comité independiente (1, 2).

La facultad de combinar la investigación médica y la asistencia al enfermo, con el fin de adquirir nuevos conocimientos médicos, debe reservarse exclusivamente a aquellos casos en que la investigación médica se justifique por su posible valor terapéutico o diagnóstico para el paciente.

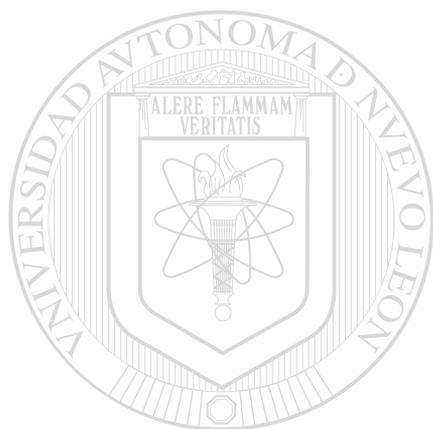
#### **Investigación biomédica no terapéutica con sujetos humanos (investigación biomédica no clínica).**

En las investigaciones médicas llevadas a cabo en un ser humano con fines puramente científicos, la misión del médico consiste en proteger la vida y la salud de la persona sometida a la experimentación biomédica.

Los sujetos deberán ser voluntarios, lo mismo si se trata de personas sanas que de pacientes cuya enfermedad no guarde relación con la experimentación proyectada.

Cuando el investigador o el equipo de investigación consideren que puede ser peligroso proseguir la investigación deberán interrumpirla.

En las investigaciones en seres humanos, el interés de la ciencia y de la sociedad jamás deberá prevalecer sobre las consideraciones relacionadas con el bienestar del sujeto.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**APENDICE B**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE, MODELO PARA PACIENTES CON TRASPLANTE HEPATICO**

**TITULO DEL ESTUDIO:** Fibrogénesis hepática en pacientes con trasplante de hígado y recidiva de infección por virus de la hepatitis C: papel patogénico del TGF $\beta$ .

Investigador principal: Dr. Antoni Rimola

Colaboradores: Dres. Parés, Caballeria, Miquel y Cisneros.

### **INFORMACION PARA EL PACIENTE:**

La mayoría de pacientes, que como Ud, han recibido un trasplante hepático por una cirrosis por virus C presentan la reaparición del virus en el nuevo hígado. Ello suele causar una hepatitis crónica la cual presenta un curso que aún o está bien definido, pero que puede ser muy variable de un paciente a otro. No obstante, una proporción de pacientes desarrollan cicatrices en el nuevo hígado debido a su infección por virus C, lo que puede alterar su correcto funcionamiento. Las cicatrices son conocidas técnicamente con el nombre de *fibrosis*, y su formación con el nombre de *fibrogénesis*, palabra que figura en el título del estudio. Los mecanismos y factores que influyen en el desarrollo de estas cicatrices no son conocidos.

Por ello hemos diseñado el presente estudio con objeto de conocer determinados factores que podrían jugar un papel importante en la formación de cicatrices en el nuevo hígado infectado por virus C. Uno de estos factores es el TGF $\beta$  que figura en el título del estudio y que podría ser uno de los mayores responsables de las mencionadas cicatrices. Asimismo, también nos interesa conocer si el tratamiento contra el rechazo que recibe Ud, puede influir en la aparición de las cicatrices hepáticas.

El mejor conocimiento de los procesos que provocan cicatrices en el hígado de los pacientes que, como Ud., tienen un trasplante hepático puede en un futuro contribuir a mejorar su tratamiento.

Para la realización de este estudio solo hace falta un poco de tejido hepático que se puede obtener aprovechando parte de la biopsia que hemos de practicarle a Ud. por motivos estrictamente de su salud y de control de nuevo hígado. Por tanto, la participación en este estudio no representa ningún riesgo ni ningún esfuerzo especial para Ud.

Su decisión de participar en este estudio es completamente voluntaria. En caso de no aceptar su participación, debe saber que ello no repercutirá negativamente en su control y tratamiento ni alterará la relación con su médico. Asimismo, puede Ud. retirar su consentimiento en cualquier momento.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE.

**Titulo del estudio:** Fibrogénesis hepática en pacientes con trasplante de hígado y recidiva de infección por virus de la hepatitis C: papel patogénico del TGFβ.

Yo.....

*(nombre y apellidos, escritos por el propio paciente)*

1. He leído la hoja de información que se me ha entregado.
2. He podido hacer preguntas sobre el estudio.
3. He recibido suficiente información sobre el estudio.
4. He hablado con .....  
*(nombre del médico que le ha informado)*
5. Comprendo que mi participación es voluntaria.
6. Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que ello repercuta en mis atenciones médicas.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Firma del paciente

Firma del médico

DNI del paciente:

Fecha:.....

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE. MODELO PARA PACIENTES SIN TRASPLANTE HEPATICO**

**TITULO DEL ESTUDIO:** Fibrogénesis hepática en pacientes con trasplante de hígado y recidiva de infección por virus de la hepatitis C: papel patogénico del TGF $\beta$ .

Investigador principal: Dr. Antoni Rimola

Colaboradores: Dres. Pares, Caballeria, Miquel y Cisneros.

### **INFORMACION PARA EL PACIENTE:**

La mayoría de pacientes que han recibido un trasplante hepático por una cirrosis por virus C presentan la reaparición del virus en el nuevo hígado. Ello suele causar una hepatitis crónica la cual presenta un curso que aún o está bien definido, pero que puede ser muy variable de un paciente a otro. No obstante, una proporción de pacientes desarrollan cicatrices en el nuevo hígado debido a su infección por virus C, lo que puede alterar su correcto funcionamiento. Las cicatrices son conocidas técnicamente con el nombre de *fibrosis*, y su formación con el nombre de *fibrogénesis*, palabra que figura en el título del estudio. Los mecanismos y factores que influyen en el desarrollo de estas cicatrices no son conocidos.

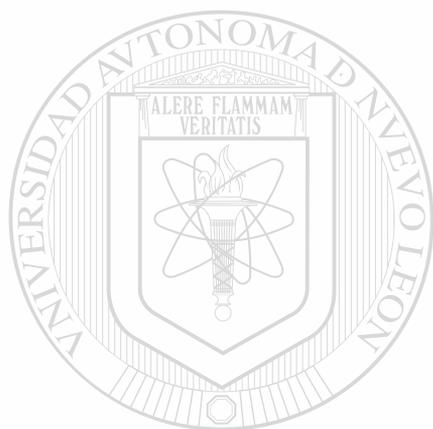
Por ello hemos diseñado el presente estudio con objeto de conocer determinados factores que podrían jugar un papel importante en la formación de cicatrices en el nuevo hígado infectado por virus C. Uno de estos factores es el TGF $\beta$  que figura en el título del estudio y que podría ser uno de los mayores responsables de las mencionadas cicatrices. Asimismo, también nos interesa conocer si el tratamiento contra el rechazo que reciben estos pacientes puede influir en la aparición de las cicatrices hepáticas.

Este tipo de estudio necesita la participación de dos grupos de pacientes: el grupo de pacientes con trasplante hepático, que es el grupo en quienes interesa comprobar si existen las alteraciones mencionadas anteriormente o no, y otro grupo de pacientes sin enfermedades en el hígado, quienes lógicamente no presentan ninguna de las alteraciones a estudiar. Este segundo grupo, con el hígado normal, es necesario para poder comparar los resultados obtenidos en los pacientes trasplantados con su nuevo hígado alterado por el virus C.

Para la realización de este estudio hace falta un poco de tejido hepático que se puede obtener fácilmente aprovechando la operación a la que debe Ud. ser sometido. Durante esta operación el cirujano visualizará perfectamente su hígado y podrá realizarle una biopsia hepática sin que ello represente ningún riesgo para Ud. La realización de la biopsia dura aproximadamente un minuto por lo que su intervención quirúrgica prácticamente no se alargará.

Su decisión de participar en este estudio es completamente voluntaria. En caso de no aceptar su participación, debe saber que ello no repercutirá negativamente en su control y tratamiento ni alterará la relación con su médico. Asimismo, puede Vd. retirar su consentimiento en cualquier momento.

Si decide participar en el estudio le expresamos nuestro agradecimiento no solo en nombre propio sino también y muy especialmente en el de los pacientes con trasplante hepático a los que va dirigido este estudio.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE.

**Título del estudio:** Fibrogénesis hepática en pacientes con trasplante de hígado y recidiva de infección por virus de la hepatitis C: papel patogénico del TGF $\beta$ .

Yo.....

*(nombre y apellidos, escritos por el propio paciente)*

1. He leído la hoja de información que se me ha entregado.
2. He podido hacer preguntas sobre el estudio.
3. He recibido suficiente información sobre el estudio.
4. He hablado con .....  
*(nombre del médico que le ha informado)*
5. Comprendo que mi participación es voluntaria.
6. Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que ello repercuta en mis atenciones médicas.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Firma del paciente

Firma del médico

DNI del paciente:

Fecha:.....

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

**Laura Esthela Cisneros Garza**

**Candidata para el Grado de**

**Doctorado en Medicina con especialidad en Hepatología**

**Tesis: FIBROGENESIS HEPÁTICA EN LA RECIDIVA C POSTRASPLANTE:  
PAPEL PATOGENICO DEL TGF  $\beta$**

**Campo de Estudio: Ciencias de la Salud**

**Biografía:**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Datos Personales:** Nacida el 24 de Octubre de 1962 en la ciudad de Monterrey ®

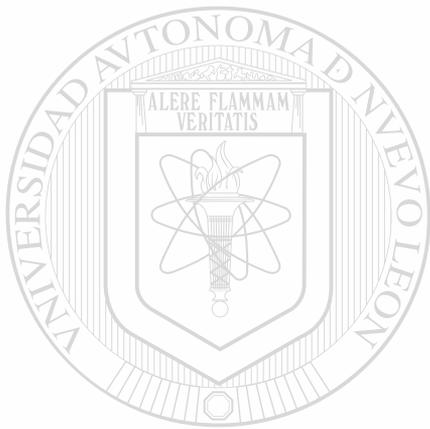
N.L.México. Hija del Sr. Héctor Cisneros Ramos y Sra. María Teresa Garza Cantú.

**Escolaridad:** Egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Médico Cirujano y Partero en 1985.

**Experiencia profesional:** Gastroenterología: laborando desde hace 14 años en el Instituto Mexicano del Seguro Social.

Endoscopia Digestiva diagnóstica y terapéutica de Marzo a Noviembre de 1997 en el Hospital Fujigaoka, Universidad de Showa, Yokohama, Japón.

Hepatología: Entrenamiento en Hepatología y en transplante hepático de Abril del 2000 a Septiembre del 2001 en el Hospital Clinic i Provincial de Barcelona España.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



