

# 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 periodo 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, dónde 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 reemplazar 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 (Transplant 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 anestelistas, 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
- Autoimmune
- 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 sea 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 periodos 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, ingesta 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 >60mmHg 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 6 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 celíaco 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
- Intradermoreacción 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
- Bilirrubina >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 Hepatorrenal ( 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 Hepatorrenal (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 (*Cylindrocarpon 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 calcineurinfosfatasa. Una de las sustancias de la calcineurinfosfatasa 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 xantosina 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 $\beta$ ).**

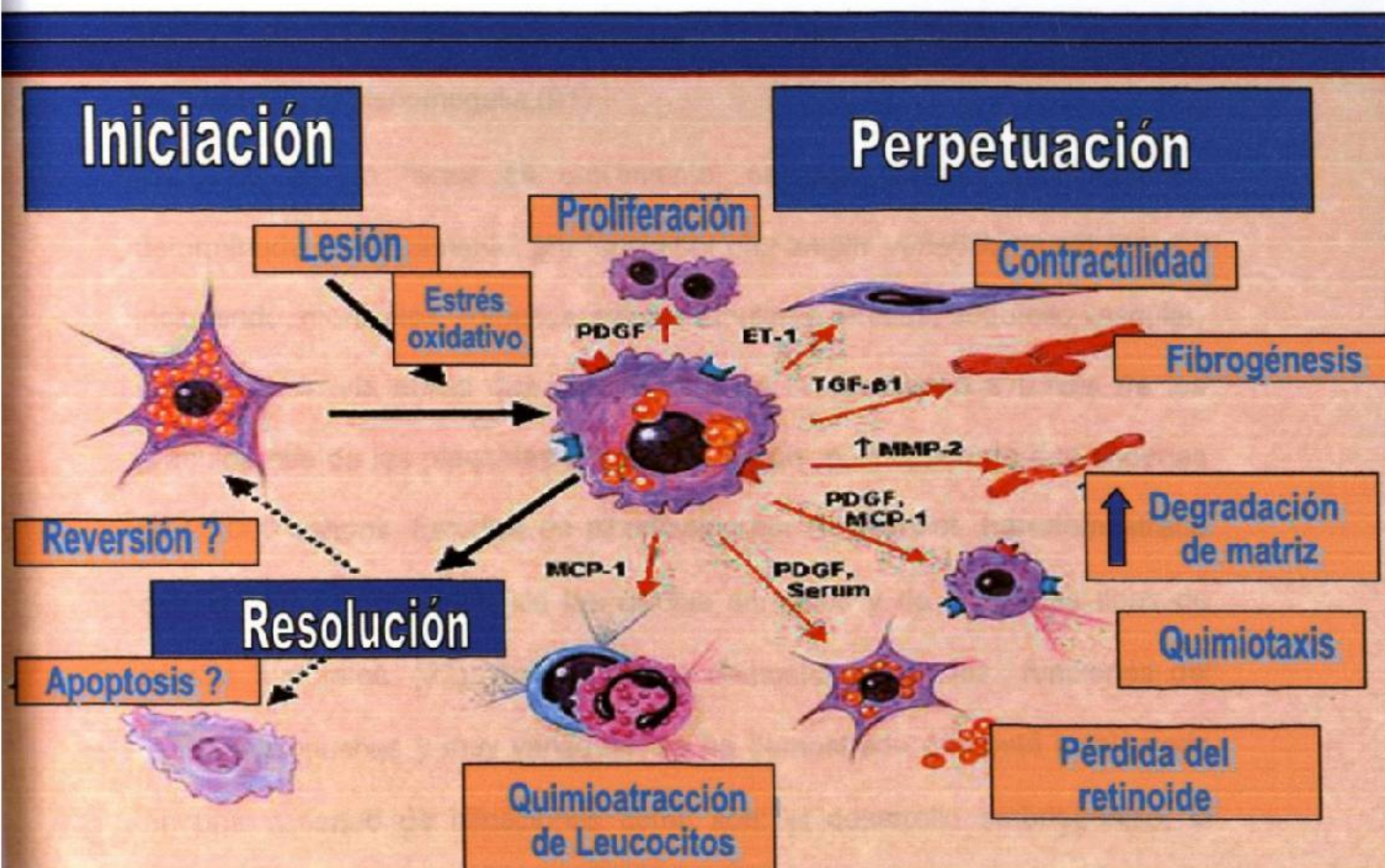
La fibrosis hepática, es actualmente un proceso reversible, es una respuesta a curación de heridas caracterizada por la acumulación de matriz extracelular que sigue a las formas crónicas de las enfermedades hepáticas(85,86). El principal evento, es decir, el evento central en la fibrosis hepática, es la activación de las células estrelladas, conocidas previamente como lipocitos, células ito, células perisinusoidales, o células almacenadoras de grasa. Estas células perisinuosidales 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 transporta 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 Northern blot 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 mRNAde 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

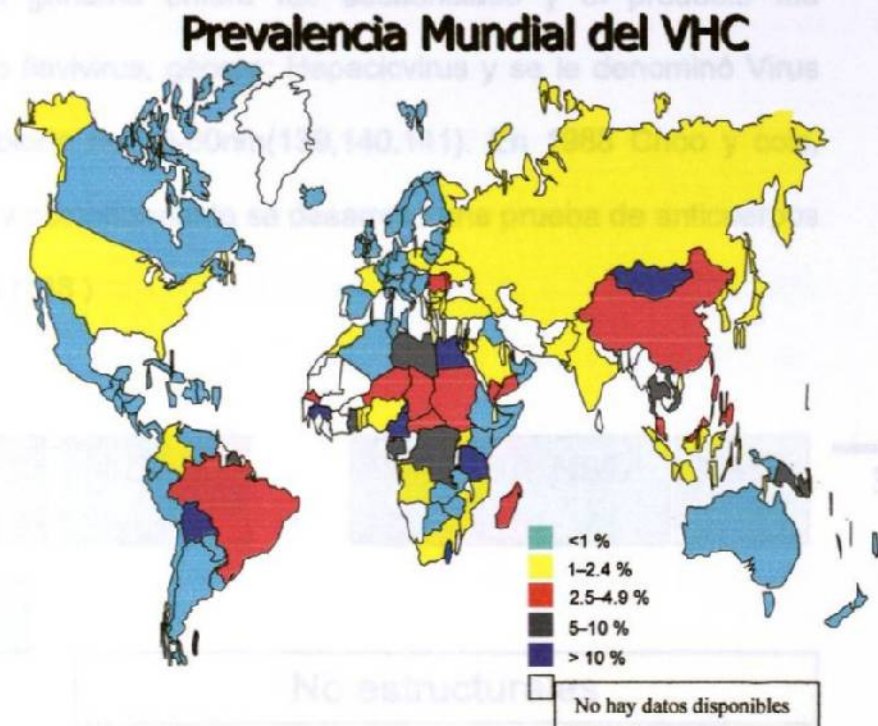


incremento de 2 a 4 veces más en el RNAmTGF $\beta$ 1, así como prolongación de su vida media en respuesta a ciclosporina (95,96).

### **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).



**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)

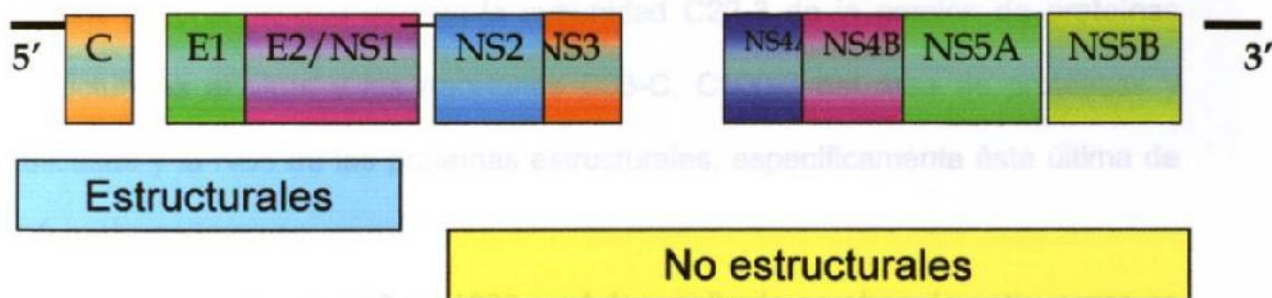


Figura 3. El Genoma del Virus de la Hepatitis C.

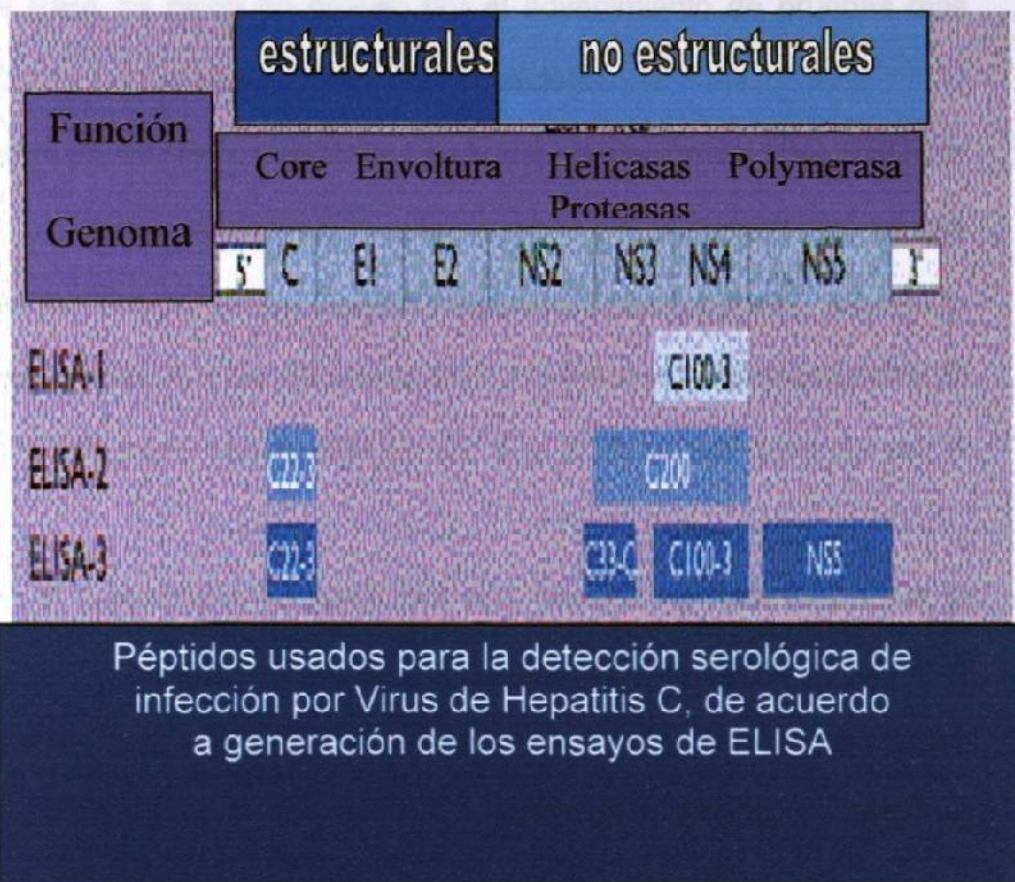
### 1.10.1 HISTORIA NATURAL VHC

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.

**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 Cyclor</b>	<b>en investigación</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  81% = 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 período 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 período 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 colestásia 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.

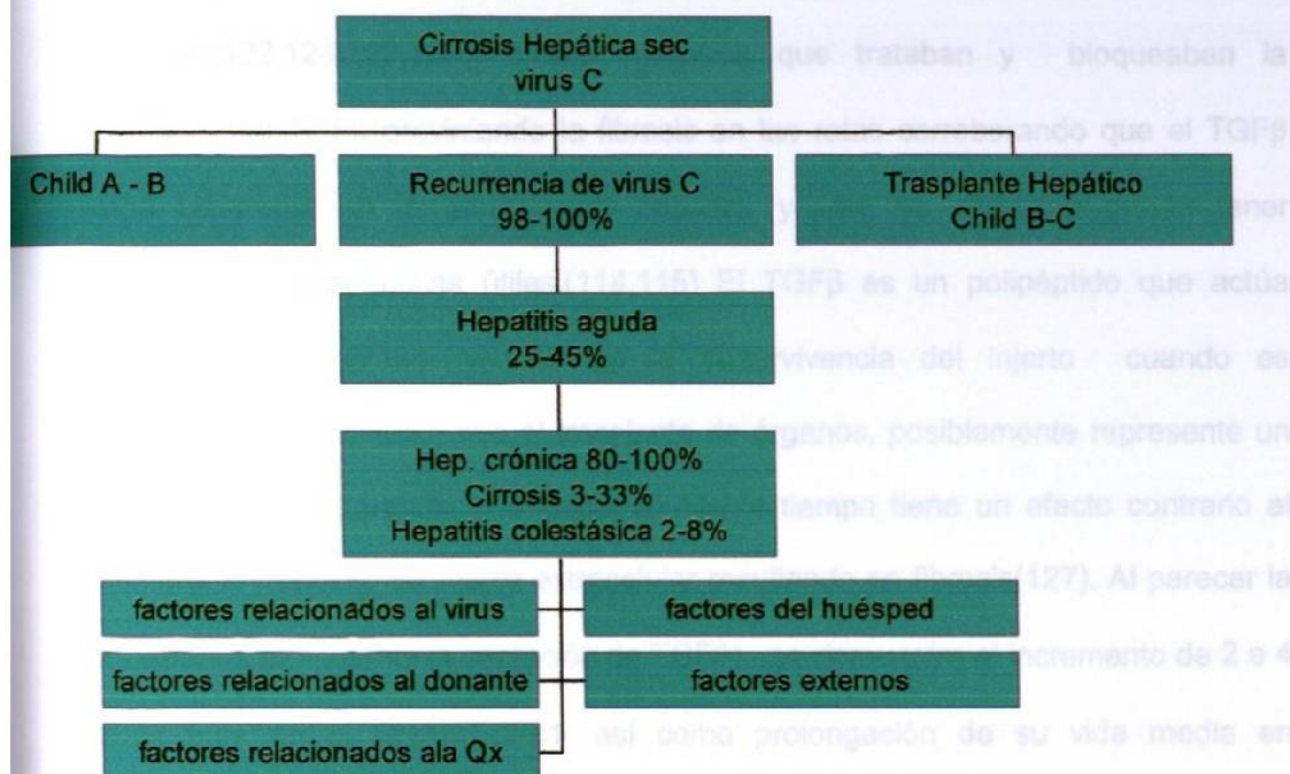
d) coinfecciones con otros virus como el del VIH , o el VHD, CMV, VHB (156) aumenta la severidad del daño histológico(156).

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**

### 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- $\beta$  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.

Ultracentrífuga 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

Microcentrífuga 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)

Laurilsarcosilsódico (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.

### **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 período comprendido de agosto de 2000 agosto de 2001.

## **2.4 METODOS**

### **2.4.1 Diseño del Estudio**

Estudio Observacional Analítico, Trasversal 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%)

$Q_1 = 0.5$

$Z_{\beta} = 1.2$  Potencia del 80%

$P_2 = 0.10$

$P_1 = 0.5$

$Q_2 = 0.90$

$$n = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 (P_1 Q_1 + P_2 Q_2)}{(P_1 - P_2)^2} = 17 \text{ pacientes}$$

**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

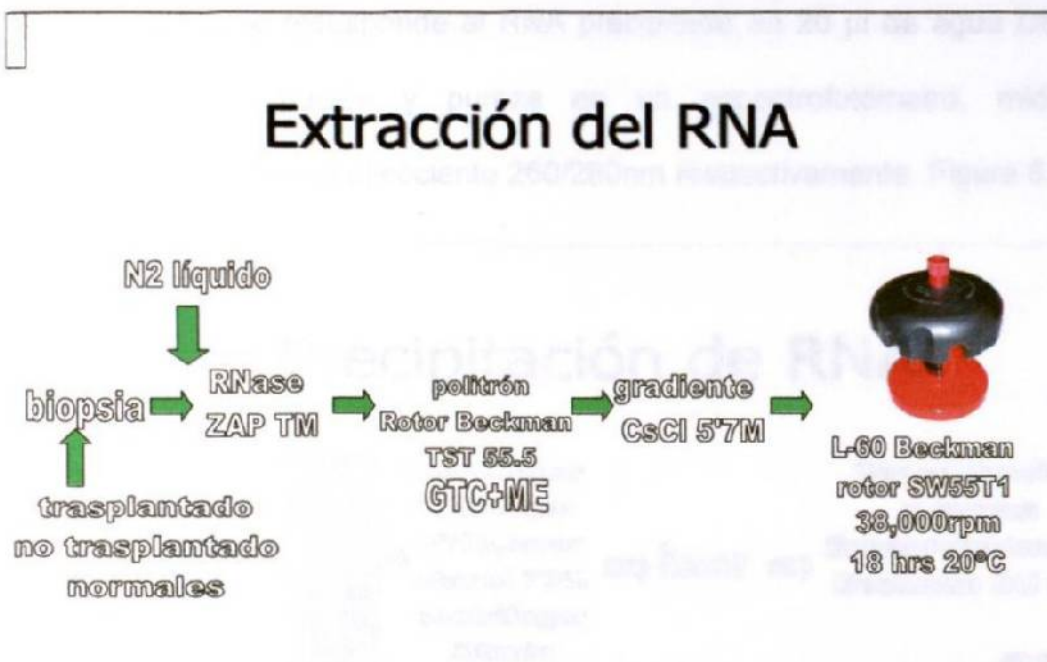
los no trasplantados que incluía aquellos pacientes con hepatitis crónica tipo C y los pacientes con cirrosis hepática de etiología C.

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 tiocianato 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 esterilizadas 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**

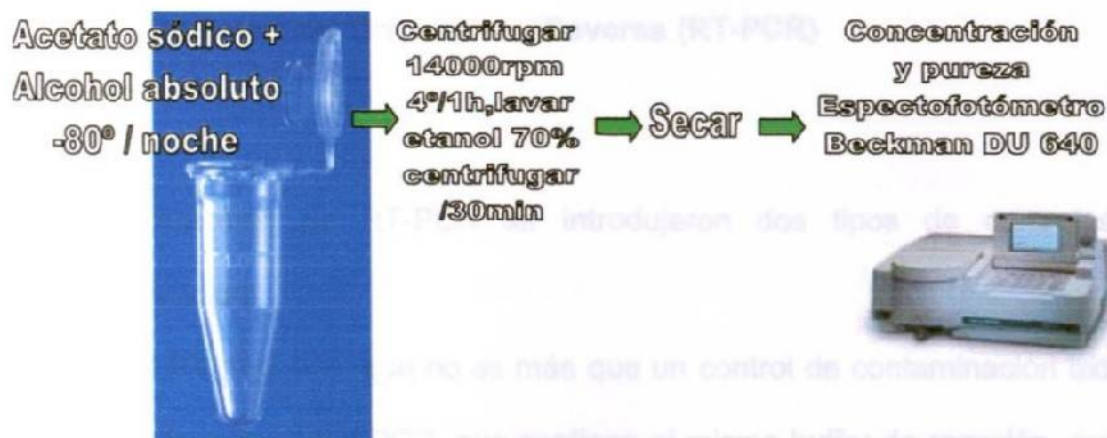
### 2.5.2 Precipitación del RNA

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.

## Precipitación de RNA



**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 hexanucleótidos ("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° dónde los primeros hexámeros se unen al RNA; 60 min a 42° dónde el RNA es retrotranscrito a cDNA y 5 min a 99° dónde la AMV Transcriptasa Reversa es desnaturalizada para impedir subsiguientes interferencias. El producto de reacción se guarda a -20° Figura 9.



**Figura 9. Determinación de los niveles de RNA $\alpha$ TGF $\beta$  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 GADPH.
- 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.

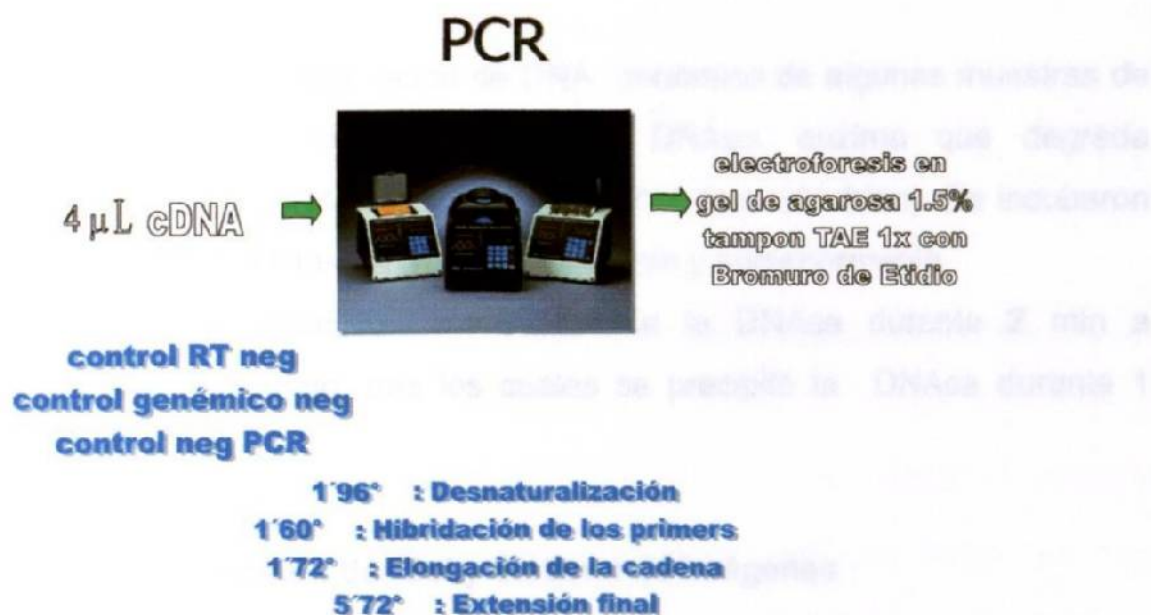


Figura 10. Diagrama de la estrategia para la obtención de DNA de doble cadena por PCR.

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

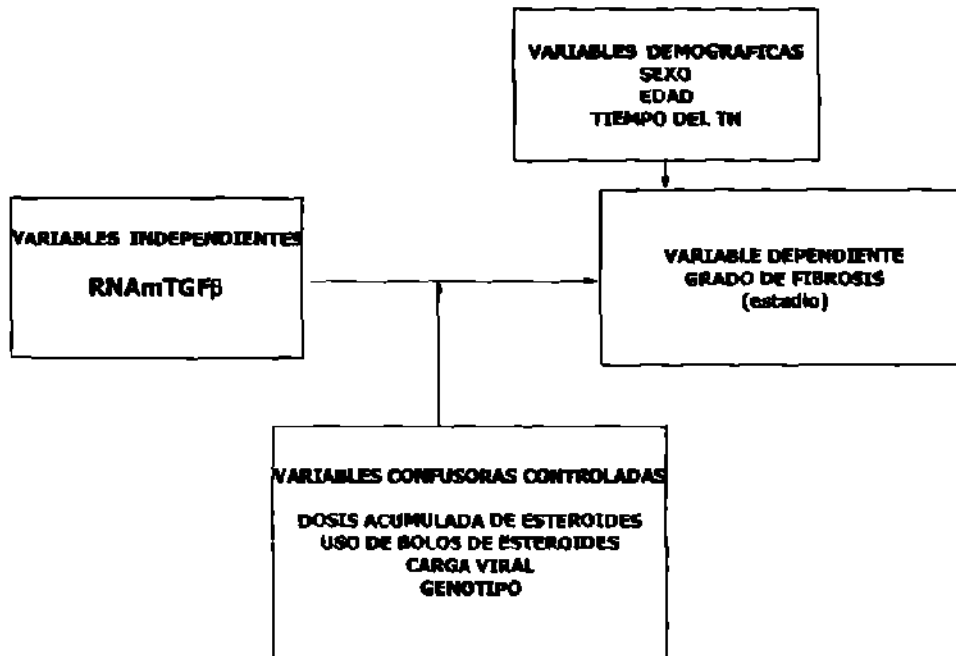


**Figura 11. Documentación del gel y sistema de imágenes**

### 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.

## TIPO DE VARIABLES

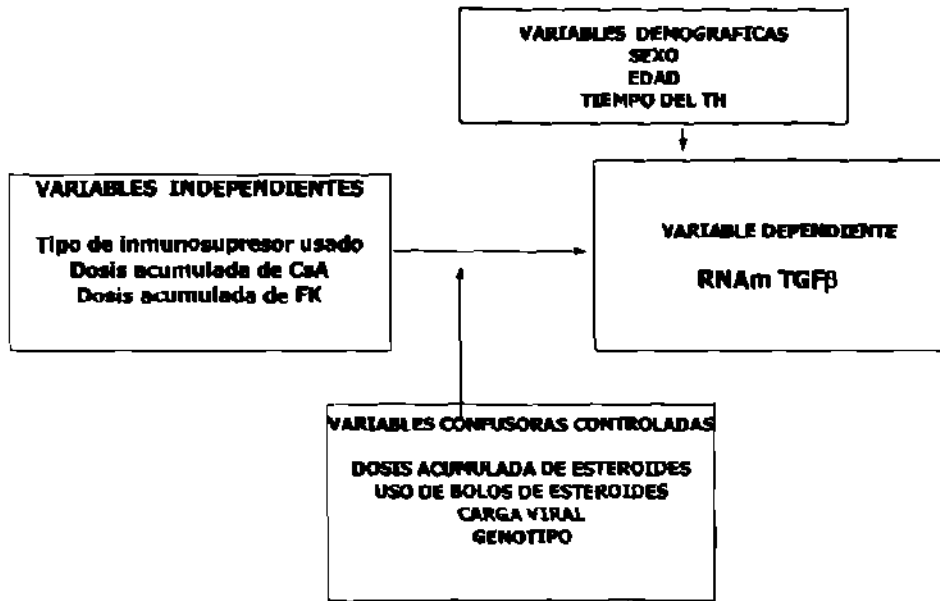


Figura 13. Tipo de variables (b)

### 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.

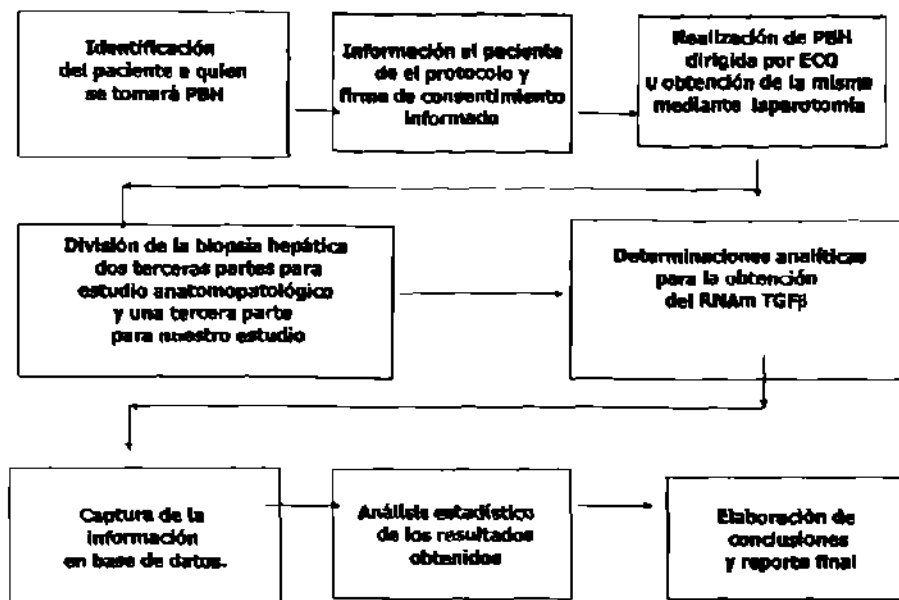
## **2.8 Aspectos Éticos**

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 RNAmTGF $\beta$ . 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 tuvieran 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