

MÓDULO I

Discusión

Drs. JAIME PONIACHIK, GLADYS SMOK, ANNA MAE DIEHL,
MIGUEL BRONFMAN y LUIS QUIÑONES

Pregunta de un asistente: Las tinciones habituales permiten demostrar la existencia de esteatosis o esteatohepatitis. ¿Hay algún tipo de técnica que permita detectar su origen y determinar si está ligada al alcohol? Y segundo: ¿qué factores histológicos permiten predecir el curso de esa esteatosis o esteatohepatitis?

Dra. Smok: No sé si existe una técnica que permita diferenciar entre grasa originada por alcohol o por otro mecanismo. En relación a lo segundo, es difícil establecer factores pronósticos a base de marcadores histológicos; se ha ideado un sistema de puntaje basado en el grado de actividad de la inflamación, es decir, de la magnitud del daño hepatocelular secundario a la inflamación, y en la etapa evolutiva en que se encuentra la enfermedad, de acuerdo al grado de fibrosis o a la eventual cirrosis que pudiera estar establecida. Con esos dos parámetros, se asigna un puntaje que podría ser útil para seguir la evolución de la enfermedad, predecir el pronóstico y evaluar la respuesta al tratamiento.

Pregunta de un asistente: Varios expositores han mencionado marcadores de tipo bioquímico que podrían tener una traducción visual, sea por luminiscencia o por alguna otra técnica. Quisiera preguntar a los doctores Diehl, Quiñones y Bronfman qué técnicas utilizan para detectar cambios bioquímicos en sus modelos experimentales o clínicos.

Dra. Diehl: Lo que hemos usado, más que todo en ratones, son anticuerpos que quizás puedan reaccionar en seres humanos; de hecho, en los estudios de biopsias hepáticas realizados en ratones con proteína 2 desacoplante, usamos un anticuerpo que está disponible comercialmente en Santa Cruz. En seres humanos con distintos tipos de hígado graso hemos encontrado que en algunos hay un aumento de la proteína desacoplante 2, que tiende a ser mayor en pacientes con esteatosis más graves. Es el único marcador utilizado en ratones que se ha aplicado también en pacientes.

Dr. Bronfman: En nuestro caso, las mediciones de actividad enzimática son las mismas en humanos y en ratas, de modo que los anticuerpos o las técnicas de biología molecular que se han aplicado también sirven para los seres humanos. Sin embargo, el problema más serio de este tipo de análisis, más que la técnica, es que el modelo animal muchas veces no es totalmente extrapolable al ser humano, porque el metabolismo lipídico de éste es diferente al de la rata. Específicamente, el PPAR alfa se expresa menos en seres humanos que en ratas, y parece que interactúa más con el factor hepático nuclear 4 en los primeros que en las segundas. Es un problema que no hemos podido resolver, salvo con el uso de algunas líneas celulares hepáticas humanas, que tampoco son idénticas al hígado humano real.

Dr. Quiñones: En nuestro caso, el panorama experimental está hecho absolutamente en seres

humanos y está enfocado al estudio de las características genéticas de los distintos individuos, por medio de la especie RFLP, es decir, a la detección de polimorfismos con enzimas de restricción, que luego se correlacionan con el nivel de actividad de la enzima en estudio, que sería causante, en gran parte, del estrés oxidativo.

Todo esto se analiza en pacientes obesos o alcohólicos con esteatohepatitis, aunque también hemos hecho algunas aproximaciones en pacientes no alcohólicos que ingieren alcohol sólo en el momento de la prueba, con lo que hemos logrado establecer que existe un aumento mayor de la actividad en las personas que tienen las variantes alélicas asociadas a mayor velocidad de transcripción, cuya prevalencia no es despreciable: en nuestro grupo de estudio, alrededor de 17 a 19% de la población era portadora de estas variantes.

El aspecto de la asociación con la obesidad recién se está estudiando. Para eso se está intentando establecer si los obesos con esteatohepatitis tienen realmente mayor actividad genotípica de la enzima.

Pregunta de un asistente: Estas variantes alélicas, ¿tienen relación con algún factor étnico en nuestra población?

Dr. Quiñones: Al parecer, sí. En un estudio tomamos individuos franceses como parámetro de caucásicos, aunque también había individuos de otro país, y los comparamos con asiáticos. La característica genética de estas variantes alélicas en la población chilena es exactamente intermedia entre los caucásicos y los asiáticos, de modo que es probable que haya un factor étnico.

Pregunta de un asistente: ¿De qué tamaño son los grupos?

Dr. Quiñones: Nuestros grupos son de alrededor de 200 a 250 personas. El grupo francés es de 180 y los estudios con asiáticos tienen habitualmente un poco más, porque ellos tienen mayor cantidad de muestras y necesitan que sean más representativos de su población.

Dr. Poniachik: Quería preguntar a las doctoras Smok y Diehl, por qué cuando aparece mucha fibrosis y cirrosis puede desaparecer la esteatosis.

Dra. Diehl: No tengo idea. Aunque la persona siga siendo obesa, cuando presenta cirrosis la grasa desaparece, pero no sé por qué.

Dr. Iturriaga: El hígado graso pasa a esteatohepatitis cuando aparece necrosis e inflamación. Sin embargo, tanto en la entidad alcohólica como en la no alcohólica la inflamación es muy poco prominente, mucho menos que en los daños hepáticos producidos por virus o por fármacos, y, cuando aparece, es una mezcla típica de polimorfonucleares. Quiero saber si estos hechos morfológicos les sugieren algunos mecanismos patogénicos.

Dra. Diehl: Un dato interesante de considerar es que primero se produce la lesión de la célula y después viene la inflamación. Tradicionalmente, se ha propuesto que las células inflamatorias llegan al hígado y matan a los hepatocitos, pero, como usted sugiere, si así fuera, debería haber más inflamación en el hígado. La otra posibilidad es que las células mueran primero y eso atraiga las células inflamatorias hacia el hígado, de modo que la inflamación sería secundaria y no primaria. Esto es muy difícil de estudiar.

Dr. Israel: Dra. Diehl, ¿tiene alguna evidencia de lo que sucede con el receptor de TNF alfa 1 en sus animales obesos? Al parecer, esto empieza como una apoptosis que después se evita. ¿Podría haber mayor cantidad de receptores TNF alfa 1 en sus datos?.

Dra. Diehl: Según los datos que hemos obtenido en los estudios acerca del tratamiento de hígado graso en modelo animal, pienso que la capacidad del tratamiento para inhibir el TNF alfa es muy importante para el efecto beneficioso de la terapia. De hecho, hemos estado analizando el receptor TNF alfa 1 mediante análisis de RNA, y aparentemente no está aumentado, sino más bien disminuido. Si se cruza el ratón *obob* con uno sin receptor de TNF alfa, ese animal va a tener menos hígado graso, y si se trata el animal obeso con anticuerpos contra TNF alfa 1, con sólo cuatro inyecciones se puede eliminar completamente el hígado graso, lo que demuestra que si se bloquea el TNF alfa 1 no se produce la enfermedad. Sin embargo, no sabemos por qué sucede esto.

Dr. Videla: Dra. Diehl, quisiera saber si en el modelo experimental que usted ha desarrollado hay cambios en el metabolismo del óxido nítrico y qué relevancia tendría eso.

Dra. Diehl: Inicialmente pensamos que la producción de NO disminuía, pero luego nos dimos cuenta de que no es así, sino que se induce normalmente en los macrófagos, y tal vez más en el hígado, de modo que nuestros resultados no se pueden explicar por una disminución del óxido nítrico. Tampoco sabemos si el aumento contribuye o no al proceso.

Dr. Koch: Una pregunta para la Dra. Diehl. Un modelo experimental conocido hace muchos años, que morfológicamente se parece mucho a la esteatohepatitis no alcohólica, es el de la colinodeficiencia, que produce hígado graso, respuesta inflamatoria, desarrollo de fibrosis y cirrosis, y, eventualmente, carcinogénesis hepática. ¿Qué opina usted de la utilidad de este modelo experimental para estudiar las variables que nos interesan?

Dra. Diehl: La deficiencia de colina causa estrés oxidativo porque priva el hígado de antioxidantes, de manera que es un modelo muy útil para estudiar lo que pasa en esa situación, pero este modelo no es extrapolable a la esteatohepatitis no alcohólica, porque la mayoría de los pacientes que tienen hígado graso no alcohólico no tienen deficiencia de colina y los individuos con deficiencia de colina en este modelo no son obesos, sino más bien desnutridos, y no tienen resistencia a la insulina. Ese modelo es muy útil para estudiar lo que pasa cuando hay deficiencia de antioxidantes en el hígado, pero no se puede saber si ese mismo mecanismo se presenta en el hígado graso no alcohólico.

Hemos observado que muchos mecanismos se producen en ambos modelos, pero la deficiencia de colina tiende al desarrollo de fibrosis, mientras que en el ratón *ob/ob* la fibrosis podría inhibirse. Esto se puede deber al tercer *hit*. El ratón *ob/ob* también tiene un aumento de la incidencia de cáncer hepatocelular, lo que a su vez habla de los posibles mecanismos del cáncer, que quizás no necesite cirrosis. Esto es muy interesante, porque en la clínica se acostumbra diagnosticar hepatocarcinoma en pacientes con cirrosis, pero tal vez el proceso carcinogénico comience mucho antes; tal vez ya esté presente en la etapa de hígado graso, y quizás no se necesite tener cirrosis para tener cáncer. La comparación de estos dos modelos nos va a permitir aprender mucho.

Dr. Armas: ¿No le perturba el hecho de que su modelo experimental utiliza un animal de vida corta para estudiar una enfermedad que necesariamente es de vida larga?

Dra. Diehl: Estoy de acuerdo, pero es a la vez una ventaja y una desventaja. Lo bueno es que no tendremos que esperar 30 años y correr el riesgo de morirnos antes de tener los resultados. Lo malo es que tal vez no podamos ver nunca las etapas tardías de la enfermedad. O sea, los animales son útiles, porque pueden ser muy bien controlados y permiten estudiar en forma muy precoz los episodios de la enfermedad, pero no sirven para ver los episodios tardíos,

por lo menos el ratón *ob/ob*. Tendremos que buscar otros modelos animales y luego ver, finalmente, qué sucede en las personas. Por lo menos el modelo animal permite concentrar el estudio en algunas áreas y así progresar más rápidamente en los estudios posteriores en seres humanos.

Dr. Arrese: Dr. Quiñones, ¿ha estudiado otros polimorfismos que se han mencionado como posibles participantes en la esteatohepatitis alcohólica y en algunas poblaciones no alcohólicas, como el promotor de TNF alfa?

Dr. Quiñones: La verdad es que no. Hasta el año pasado estudié los polimorfismos asociados a carcinogénesis química; así nació el interesante estudio de CYP2E1 como una enzima de susceptibilidad carcinogénica y descubrimos que tenía una importante participación en la esteatohepatitis. Ahora estoy muy interesado en evaluar otros factores, de tal forma de complementar y establecer una mayor susceptibilidad, es decir, determinar cuál grupo de factores define con mayor certeza el riesgo de presentar esteatohepatitis, pero hasta ahora no lo he hecho.

Dr. Riquelme: Dr. Bronfman, el efecto de la troglitazona sobre la esteatosis y la esteatohepatitis ¿tiene mayor relación con la proliferación peroxisomal o con el efecto como droga antidiabética sobre la hiperinsulinemia?

Dr. Bronfman: Es una pregunta difícil de contestar, porque no conocemos el mecanismo de acción de la troglitazona. Hasta hace seis meses parecía claro que era un ligando PPAR-gamma y que modulaba acciones por esta vía, pero en experimentos recientes se ha demostrado que este medicamento no siempre modula fenómenos fisiológicos vía PPAR-gamma. Un investigador de los Estados Unidos generó macrófagos a partir de *stem cells* con *knock-out* de PPAR gamma y comparó macrófagos con y sin PPAR-gamma, y así comprobó que no todos los efectos de la troglitazona ocurrían vía PPAR-gamma, pero desconozco la relación de esto con los problemas hepáticos humanos.

Pregunta de un asistente: Puesto que los ácidos grasos poliinsaturados son inductores del citocromo que participa en el metabolismo del alcohol, en un alcohólico que tenga alguna variante de esta enzima, ¿puede ser contraproducente la prescripción de ácidos grasos poliinsaturados, si es obeso?

Dr. Quiñones: Precisamente, esa es la duda. Si llegamos a establecer que estas variantes alélicas son de riesgo, la prescripción de un fármaco pro oxidante o de ácidos grasos poliinsaturados, en una persona con esa característica genética, aumentaría el riesgo. Entonces, la idea es evaluar todas las posibilidades y definir en qué casos es recomendable y en qué casos no lo es, pero hasta ahora sólo existen hipótesis basadas en los pocos antecedentes que se encuentran en la literatura.