

Asociación entre factores angiogénicos solubles y marcadores de progresión de la enfermedad en pacientes con hepatitis crónica C

X. Salcedo Mora, P. Sanz-Cameno, J. Medina, S. Martín-Vílchez, L. García-Buey, M. J. Borque y R. Moreno-Otero

Unidad de Hepatología. Hospital Universitario de La Princesa. Universidad Autónoma. Madrid

RESUMEN

Objetivos: el objetivo fue comparar los niveles de los factores solubles de angiogenesis (FSA) en pacientes con hepatitis crónica C (HCC) con individuos sanos, e investigar la asociación entre los niveles de FSA y los marcadores histológicos y bioquímicos de la enfermedad.

Método: treinta y seis pacientes (69,4% hombres) positivos para el ARN-VHC fueron incluidos; a todos se les realizó biopsia hepática antes del tratamiento. Los niveles séricos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), de la forma soluble de sus receptores Flt-1 y Flk-1, del factor de crecimiento placentario (PIGF), de la angiopoyetina-2 (Ang-2) y de la forma soluble de su receptor Tie-2 fueron determinados por ELISA. Se analizaron también 15 controles sanos.

Resultados: al comparar los pacientes con HCC y los controles se observó una elevación significativa en los niveles de PIGF (22 ± 5 vs. 18 ± 8 pg/ml; $p < 0,05$), Ang-2 (1265 ± 385 vs. 833 ± 346 pg/ml; $p < 0,005$) y sFlt-1 (95 ± 22 vs. 72 ± 14 pg/ml; $p < 0,0001$). Se observó una correlación entre el VEGF y el Tie-2 con el grado de inflamación; entre PIGF y el estadio de la fibrosis; y entre Flt-1 y Flk-1 y los niveles de transaminasas ($p < 0,05$ en todos los casos).

Conclusiones: en pacientes con HCC se observó una elevación significativa de los FSA demostrándose una correlación significativa entre los niveles séricos de ciertos FSA y el grado de inflamación, el estadio de fibrosis y los niveles de transaminasas.

Palabras clave: Angiogénesis. Factores solubles. ARN-VHC. Hepatitis crónica C. Fibrosis. Inflamación.

INTRODUCCIÓN

La hepatitis crónica C (HCC) es una enfermedad progresiva que se caracteriza por necrosis hepatocelular, inflamación y fibrosis (1,2). Se ha observado que distintas hepatopatías cursan con la aparición de un fenómeno de angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos; la patología mejor estudiada es el carcinoma hepatocelular, pero también se ha reconocido en la HCC (3,4). Así mediante tinción inmunohistoquímica se demostró en biopsias de pacientes con HCC, la presencia de estructuras capilares características formadas por células endoteliales (CE), CD31 positivas, en los tractos portales inflamados (4). Otra situación en la que se produce angiogénesis he-

pática es la cirrosis biliar experimental: como respuesta a un estado de hipoxia hepatocelular, se produce el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que induce proliferación vascular hepática (5).

El VEGF puede ser producido en el hígado por diferentes tipos celulares, incluyendo hepatocitos, células estrelladas hepáticas, células de Kupffer y leucocitos que integran los infiltrados (6). En el caso de las células estrelladas, hay evidencias de que pueden activarse como respuesta a un estado de hipoxia, dando lugar a la expresión de VEGF y sus receptores (7). En la respuesta angiogénica participan múltiples factores. Los más estudiados son aquellos con propiedades mitogénicas para las CE, y entre ellos, el VEGF (8) es el mejor caracterizado. Pertenece a una familia formada por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (PIGF). Estos factores se unen en las CE a receptores que poseen actividad tirosin kinasa, como Flt1 y Flk1. Otra molécula que juega un papel central en la angiogénesis es la angiopoyetina 2 (Ang-2), que en las fases iniciales de la angiogénesis desestabiliza las uniones intercelulares vasculares, para permitir que las CE proliferen. Su receptor específico se denomina Tie-2 (9-11).

Para que los factores proangiogénicos que inducen el crecimiento y la diferenciación de las CE puedan ejercer sus efectos, estas deben expresar y activar los receptores correspondientes (9). Aunque los receptores se expresan en la superficie celular, también se ha descrito un mecanismo de proteólisis en suero (12), dando lugar a una forma de expresión denominada factores solubles. La determinación en suero de los factores angiogénicos y sus receptores solubles podría representar una herramienta importante para el seguimiento de enfermedades en las cuales se ha demostrado la presencia de angiogénesis a nivel molecular, tales como la HCC, las hepatopatías autoinmunes (6) y el hepatocarcinoma (13). Un ejemplo lo constituye el carcinoma hepatocelular, donde se ha observado una relación significativa entre los niveles de VEGF en suero y su expresión en células tumorales (14), lo que indica que los niveles séricos son una estimación indirecta de la expresión del VEGF en el tumor (15).

El seguimiento clínico de una hepatopatía a menudo implica el uso de técnicas invasivas para obtener biopsias, procedimiento no exento de riesgos. Por ello es importante identificar marcadores séricos capaces de aportar información sobre el grado de progresión de la enfermedad sin necesidad de biopsiar al paciente. El primer paso para identificar tales factores es seleccionar moléculas que jueguen un papel patofisiológicamente relevante en el desarrollo de una determinada enfermedad, estudiar sus niveles en suero y analizar si existe una asociación entre esos niveles y la progresión de la patología. A este fin se encamina nuestro trabajo. *Así pues, el objetivo del presente estudio fue evaluar los niveles en suero de FSA en pacientes con HCC, y compararlos con los niveles de transaminasas en el suero, y con el estadio de fibrosis y el grado de inflamación en la biopsia, con objeto de analizar si pueden aportar información adicional relevante sobre la progresión de la enfermedad.*

MÉTODOS

En el presente estudio se incluyeron 36 pacientes (69% hombres y 31% mujeres), admitidos consecutivamente en la consulta de Hepatología del Hospital Universitario de La Princesa, con infección crónica por el virus de la hepatitis C (no cirróticos), y que cumplieran los requisitos de no sufrir otras hepatopatías, disponer de biopsia hepática y suero congelado. Los datos basales se muestran en la tabla I. Un grupo de 15 individuos sanos (73% hombres y 27% mujeres) con serología negativa para los virus de la hepatitis B y C, así como niveles séricos de enzimas

Tabla I. Datos demográficos y analíticos basales de los pacientes

	Enfermos (n = 36) promedio ± DE	Sanos (n = 15) promedio ± DE
Edad	48 ± 8	39 ± 12
Sexo (M:F)	25: 11	11: 4
AST (U/L)	46,3 ± 41,7	22,7 ± 5,1
ALT (U/L)	79,4 ± 87,1	22,9 ± 9,5
GGT (U/L)	58,0 ± 68,9	23,9 ± 21,6
FA (U/L)	139,8 ± 64,7	54,0 ± 20,3
Carga viral (X10 ⁵ UI/mL)	7,3 ± 7,2	–
Genotipo		
1	3	–
1a	8	–
1b	8	–
2a/2b	3	–
3a	11	–
4	3	–
Valoración histológica		
Grado A1	6	–
A2	26	–
A3	4	–
Estadio F1	10	–
F2	20	–
F3	6	–

hepáticas normales, fue utilizado como control. A todos los pacientes y controles sanos se les tomó una muestra de suero basal, sin que estuvieran recibiendo tratamiento alguno en ese momento.

Los pacientes con HCC eran característicamente positivos en suero para los anti-VHC (16). El diagnóstico de infección activa por el VHC se realizó mediante determinación del ARN-HCV por PCR; la carga viral fue evaluada por el método de VHC - Amplicor y VHC-Monitor (Roche diagnóstico, Basilea, Suiza) y el genotipo de VHC fue evaluado por innoLiPA (Innogenetics, Zwijndrecht, Bélgica). A todos los pacientes se les determinaron los niveles de AST (aspartato amino transferasa), ALT (alanina amino transferasa), GGT (gamma glutamil transpeptidasa), FA (fosfatasa alcalina) y plaquetas, así como la serología para VHB y VIH.

Análisis histológico: a todos los pacientes se les realizó una biopsia hepática, que se analizó utilizando el sistema de clasificación METAVIR, evaluando el estadio de fibrosis en una escala de F₀ a F₄, donde F₀ significa ausencia de fibrosis; F₁: fibrosis portal con septos, F₂: pocos septos; F₃: numerosos septos con cirrosis; F₄: cirrosis. La actividad necroinflamatoria se valoró en una escala de A₀ a A₃, donde A₀ representa ausencia de actividad; A₁: actividad leve; A₂: actividad moderada; A₃: actividad severa. La evaluación histológica fue llevada a cabo por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Princesa (Dra. A. García-Sánchez).

Niveles de FSA: las muestras de suero de los pacientes fueron obtenidas el mismo día de la biopsia hepática y se guardaron a -80 °C. Se cuantificaron los niveles séricos de VEGF, PlGF, Flt1, Flk1, Ang-2 y Tie-2 por un método de ELISA (Quantikine human, R&D SYSTEMS, Reino Unido).

Análisis estadístico: el estudio estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas, como el test de Mann-Whitney's, el test de Pearson y correlación lineal múltiple.

RESULTADOS

Los niveles séricos de PlGF de los pacientes fueron significativamente superiores a los de los controles (Tabla II). También se encontraron diferencias significativas en los valores de Ang-2 y de Flt1. Sin embargo, no se encontraron variaciones significativas entre pacientes y controles para VEGF, Tie-2, o Flk-1.

Es preciso destacar que en los pacientes con HCC se observó una correlación significativa entre el estadio de fibrosis y los niveles de PlGF (p = 0,04) (Fig. 1); también entre el grado de actividad inflamatoria y los niveles de VEGF (p = 0,04) y Tie-2 (p = 0,05). Con relación a la bioquímica hepática, se observó una correlación entre Flt1 y Flk1 con AST (p = 0,05 y p = 0,01) y ALT (p = 0,01 y p = 0,01), respectivamente.

Tabla II. Niveles séricos de los factores solubles de angiogénesis

	Enfermos		Sanos		Significación estadística (p)
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
PIGF (pg/ml)	20	15-38	16	10-38	0,01
Ang-2 (pg/ml)	1172	846-2211	723	470-1480	0,005
Flt-1 (pg/ml)	91	65-167	69	52-101	0,0001
Flk-1 (pg/ml)	1944	949-3622	2038	1046-3620	0,1
VEGF (pg/ml)	364	223-871	312	242-258	0,3
Tie-2 (ng/ml)	1,9	1,1-2,6	1,7	1,0-2,7	0,3

DISCUSIÓN

Como se ha comentado previamente, se ha descrito la existencia de un proceso de angiogénesis hepática en patologías como hepatitis viral, cirrosis, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria y hepatocarcinoma (3,4,17). La mayoría de los estudios realizados describen variaciones a nivel de expresión molecular de los distintos factores implicados en el proceso de angiogénesis (14,15).

Dado que este fenómeno puede jugar un papel patogénico en el desarrollo del daño hepático, cabe suponer que la monitorización en las muestras de suero obtenidas de los pacientes de marcadores subrogados que aporten información sobre el grado de angiogénesis, podría representar una herramienta de utilidad en el seguimiento de la enfermedad. Actualmente sabemos que en la HCC se forman nuevas estructuras vasculares en asociación con los infiltrados inflamatorios en áreas periportales (4) y también hay datos sobre algunos de los mecanismos moleculares que determinan la aparición de dichos neovasos (17). Sin embargo, se desconoce por ahora si existen factores proangiogénicos que puedan aportar información sobre la progresión de la HCC, tal y como han sido descritos en otras patologías. Por ejemplo, Oskun y cols. observaron que en pacientes con cáncer de mama, los niveles séricos de VEGF eran más elevados que en mujeres sanas ($137,2 \pm 64,7$ pg/ml frente a $107,3 \pm 50$ pg/ml) (18). De manera similar, Harris y cols. describieron en pacientes con cáncer renal niveles de Tie-2 significativamente superiores a los de los controles sanos ($0,74$ pg/ml vs. $0,56$ pg/ml) y de Flt1 (77 ± 9 pg/ml vs. 65 ± 8), antes de que los enfermos iniciaran tratamiento con Razoxane; posteriormente observaron que en los pacientes con enfermedad estable disminuían las cifras de Tie-2 ($66,9$ pg/ml) mientras que en los pacientes con enfermedad progresiva se elevaban significativamente a 83 pg/ml, sugiriendo que este factor podría ser usado como marcador de seguimiento posterior a tratamiento antiangiogénico (18,19).

En otros casos no sólo se han descrito variaciones en los niveles de factores angiogénicos entre pacientes e individuos sanos, sino que se ha descubierto que dichos marcadores pueden ser de utilidad para evaluar el pronóstico de diferentes tumores malignos, como el cáncer de colon y el mieloma múltiple (20). Por ejemplo, se ha des-

critado que los niveles en suero de Flt1 y Tie-2 en pacientes con mieloma múltiple en tratamiento con el fármaco antiangiogénico talidomida, se correlacionan con un pronóstico adverso de la enfermedad (20). De manera similar, los niveles séricos de VEGF se han propuesto en sendos estudios como marcadores de pronóstico en pacientes con sarcoidosis diseminada (21) y en la enfermedad inflamatoria intestinal (22).

Los valores séricos de VEGF también se han correlacionado con el recuento plaquetario en pacientes con hepatocarcinoma. Se ha descrito que las plaquetas circulantes transportan en sus gránulos cantidades de VEGF en presencia de tumores que no se reflejan en los valores de suero y que esta relación o cuantificación de VEGF por recuento de plaquetas podría servir como un indicador de pronóstico, ya que se observaron niveles significativamente más altos en enfermos con hepatocarcinoma que en pacientes cirróticos y controles sanos (23).

En el presente estudio se encontró una correlación positiva de los niveles de receptores solubles de VEGF (Flt-1 y Flk-1) con las enzimas indicadoras de daño hepático (AST y ALT). Asimismo, los niveles de PIGF mostraron una correlación con el estadio de fibrosis y, por otro lado, tanto los niveles de VEGF como sTie-2 se correlacionaron con la actividad inflamatoria. El hecho de que se hallaran asociaciones sólo entre determinados FSA y fibrosis en unos casos, inflamación en otros, o transaminasas en otros, podría estar relacionado con el limitado número de pacientes incluidos en el estudio. En cualquier caso, la angiogénesis es un proceso multifactorial y extremadamente complejo, que implica la participación de gran número de moléculas y células, reguladas a distintos niveles y por diferentes factores. Por tanto, es concebible que cada uno de los FSA determinados en este estudio sea estimulado y/o regulado por un proceso distinto, ya sea el proceso inflamatorio, o bien la hipoxia que ocurre en el tejido fibrosado, o bien el daño celular inespecífico. De esta manera, no es de extrañar que se puedan observar distintos grados de correlación entre cada factor y el grado de inflamación, estadio de fibrosis o niveles de transaminasas.

Nuestros resultados pueden tener importantes implicaciones clínicas. En primer lugar, la demostración de una asociación entre las variaciones de los niveles séricos de FSA y la progresión de la HCC apoya, desde un punto de

vista conceptual, el papel crítico que juega la angiogénesis en las enfermedades hepáticas crónicas, tal y como se había sugerido anteriormente (6,24). En segundo lugar, la determinación de FSA en paralelo a la carga viral y a los marcadores de fibrosis podría aportar una información complementaria para evaluar la progresión de la enfermedad. Esto sería particularmente útil si se demostrara una modulación de los niveles séricos de FSA en respuesta al tratamiento antiviral de la HCC, puesto que podría ayudar a evaluar la respuesta al tratamiento y a definir la estrategia de seguimiento óptima para cada paciente. Naturalmente, esto requerirá llevar a cabo nuevos estudios prospectivos con cohortes mayores de pacientes.

Podemos concluir que en la HCC existe un incremento de FSA, que posiblemente reflejen la actividad angiogénica a nivel hepático; igualmente parece haber una rela-

ción entre estos factores y el grado de daño histológico. Sin embargo, se necesita que en el futuro se realicen más estudios, ampliando la cohorte de pacientes, que permitan confirmar qué factor o combinación de factores proangiogénicos pudieran ser útiles como marcadores de pronóstico y progresión en la HCC.

AGRADECIMIENTOS

La Dra. X. Salcedo agradece a la Fundación BBVA-Fundación Carolina por su contribución en forma de Beca que ha sido imprescindible para realizar este estudio. El trabajo también ha sido patrocinado por fondos del Instituto de Salud Carlos III (C03/02) y del Ministerio de Salud y Tecnología (SAF 2004-07885).