

Título:

Caracterización de la interacción entre el Sistema Inmune y el Sistema Nervioso Simpático y su relación con el desarrollo de hepatocarcinoma en cirrosis.

Lema:

Sistema Nervioso Simpático y hepatocarcinoma

Introducción

La respuesta de estrés es un elemento esencial para el mantenimiento de la homeostasis [1]. Existe una estrecha interacción entre las actividades del llamado sistema de estrés y el sistema inmune constituyendo un efectivo y complejo entramado defensivo y adaptativo contra los distintos agentes lesivos para el organismo [2]. Se ha constatado que en las fases iniciales de una sepsis en las que el sistema inmune está hiperactivo se produce un incremento paralelo en el nivel de actividad tanto del eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal (HHA) como del Sistema Nervioso Simpático (SNS) [3]. Numerosas evidencias experimentales y clínicas muestran que este incremento de las actividades del HHA y del SNS durante los episodios de bacteriemia actuaría como un elemento regulador modulando los excesos de actividad del sistema inmune que pueden llegar a dañar al paciente [4, 5].

El Sistema Nervioso Simpático en los pacientes cirróticos

Los pacientes con cirrosis e hipertensión portal desarrollan un estado circulatorio hiperdinámico caracterizado por una vasodilatación esplácnica y periférica y un aumento del volumen plasmático y del gasto cardíaco. Estos fenómenos son consecuencia de una producción excesiva de sustancias vasodilatadoras, principalmente óxido nítrico, y una hiporreactividad vascular a los vasoconstrictores endógenos [6]. Con la progresión de la enfermedad se produce una importante activación del SNS en respuesta a la vasodilatación persistente que se traduce en elevadas concentraciones plasmáticas de noradrenalina [7], a pesar de lo cual la hipotensión arterial persiste debido a una menor respuesta al estímulo adrenérgico de los receptores alfa y beta de los vasos de los pacientes cirróticos [8, 9]. Numerosos autores consideran que esta activación crónica del SNS en respuesta a su situación hemodinámica estaría implicada en la respuesta inmune deficiente que se observa en los cirróticos y este efecto podría compensarse, al menos parcialmente, mediante un bloqueo farmacológico del SNS. Concretamente, los fármacos beta-bloqueantes no selectivos (BB) administrados a los pacientes cirróticos para prevenir el sangrado por varices esofágicas se han asociado a menores tasas de infección [10], a una disminución de la permeabilidad intestinal y de las concentraciones séricas de lipopolisacárido e IL-6 [11] y a una menor gravedad de la inflamación sistémica y mejora de la supervivencia en pacientes con Acute-on-Chronic Liver Failure [12]. Recientemente, nuestro grupo ha descrito que los BB modifican no sólo la respuesta inmune evocada por bacterias sino la que se produce en respuesta a la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos como el ADN bacteriano [13].

El Sistema Nervioso Simpático y el desarrollo de hepatocarcinoma en los pacientes cirróticos

Los pacientes cirróticos son una población con un riesgo elevado de desarrollar un hepatocarcinoma (HCC) que se ha estimado en 1-14% anual en pacientes con cirrosis asociada a la infección por virus de la hepatitis B, 4-14% anual en cirrosis asociadas a la infección por virus de la hepatitis C y 1% anual en cirrosis alcohólicas. El riesgo de HCC asociado a la cirrosis por esteatohepatitis no alcohólica es del 2,6% anual. Los pacientes cirróticos con una enfermedad más avanzada tienen mayor riesgo de HCC. Se han descrito varios predictores del desarrollo de HCC en relación a la gravedad de la cirrosis entre los que se incluyen parámetros sugestivos de insuficiencia hepática como la bilirrubina, albúmina y actividad de protrombina y parámetros indicativos de hipertensión portal como la cifra de plaquetas y la presencia de varices esofágicas [14]. Los pacientes con un gradiente de presión venosa portal (GPVH) > 10 mmHg tienen una incidencia de HCC del 2,1% anual mientras que aquellos con un GPVH < 10 mmHg la incidencia es de un 0,35% anual [15].

Actualmente, existen diversas opciones terapéuticas para los pacientes con HCC, especialmente si se

diagnostica en fases iniciales lo que justifica la realización de programas de vigilancia activa de detección precoz del tumor en los pacientes con cirrosis [16].

El HCC es una lesión neoplásica que tiene lugar, en más del 80% de los casos, sobre un lecho de inflamación crónica que secuencialmente progresa de fibrosis a cirrosis para terminar en el tumor. A nivel hepático pueden producirse dos grandes tipos de inflamación: una inflamación persistente como resultado de una hepatitis viral y/o por la exposición repetida a productos bacterianos consecuencia de fenómenos de translocación bacteriana o bien una inflamación estéril asociada al consumo de alcohol, esteatohepatitis no alcohólica o lesiones por fármacos [17]. El papel de la inflamación en la evolución a cirrosis es ampliamente aceptado y es dirigida por la infiltración de las células del sistema inmune (monocitos/macrófagos, linfocitos T y neutrófilos) y por células residentes en el parénquima hepático (células de Kupffer, dendríticas, sinusoidales y estrelladas) capaces de secretar numerosas citoquinas y quimioquinas. La perpetuación de esta situación en el tiempo o inflamación crónica conforma el sustrato sobre el que se desarrolla secuencialmente el proceso fibrosis-cirrosis-HCC como demuestran modelos experimentales murinos de cirrosis y HCC por exposición a tetracloruro de carbono [18].

Diversos trabajos realizados en modelos experimentales murinos de inflamación crónica y tumores han mostrado que la activación sostenida del SNS se asocia a una expresión tisular aumentada de las citoquinas IL-6 e IL-8, la supresión de las respuestas de linfocitos T citotóxicos y células NK y el reclutamiento de macrófagos hacia el tumor primario [19]. En estos trabajos se constató que los fármacos beta-bloqueantes reducen y los agonistas del receptor beta aumentan la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis en modelos de cáncer de mama, próstata, melanoma maligno y leucemia [19]. En el caso concreto de los tumores hepáticos se ha demostrado en modelos de rata con tumores inducidos químicamente con 2-acetilaminofluoreno o con 3'-metil-4-dimetilaminoazobenzeno la existencia en homogeneizados de tejido hepático de un gran aumento, basal y tras el estímulo con el agonista beta-adrenérgico isoproterenol, de la actividad de la enzima adenilato ciclasa y de la producción de AMPc, cambios bioquímicos que precedieron la aparición de los signos histológicos de cáncer. Igualmente, se ha descrito en membranas de células de HCC un incremento de la densidad de los receptores beta-2 y de su expresión génica que se acompañaba de una señal post-receptor intracelular alterada [20] y una expresión reducida de la enzima monoamino-oxidasa A (enzima metabolizadora de catecolaminas) con el consiguiente aumento de adrenalina y noradrenalina que se asociaba significativamente con el grado de invasión vascular y el desarrollo de metástasis [21].

Los fármacos beta-bloqueantes y el desarrollo de hepatocarcinoma

En 2012, Nkontchou y colaboradores publicaron los resultados de un estudio retrospectivo de casos y controles en el que observaron que 2 de cada 50 pacientes cirróticos con varices esofágicas tratados con propranolol durante 5 años desarrollaron un HCC (4%) frente a 9 de 43 pacientes de características parecidas que no habían recibido tratamiento con propranolol (21%). Esta diferencia resultó estadísticamente significativa en el análisis multivariante (HR=0,16; P=0,0005) [22]. Recientemente, nuestro grupo ha publicado el resultado del seguimiento de 173 pacientes (73 tratados y 100 no tratados con BB) durante 11 años (ver Figura 1). Durante este tiempo un total de 28 pacientes desarrollaron un HCC de los cuales 20 no habían recibido tratamiento con BB. Las comparaciones entre las proporciones acumuladas de casos de HCC entre los pacientes tratados y los no tratados con BB desde el diagnóstico de la cirrosis fueron estadísticamente significativas (6 vs. 3%, a 5 años; 19 vs. 6% a 10 años; 24 vs. 16% a 15 años; P=0.048). El análisis multivariante mostró que el tratamiento con BB era la única variable asociada significativamente con el desarrollo de HCC en este estudio [23].

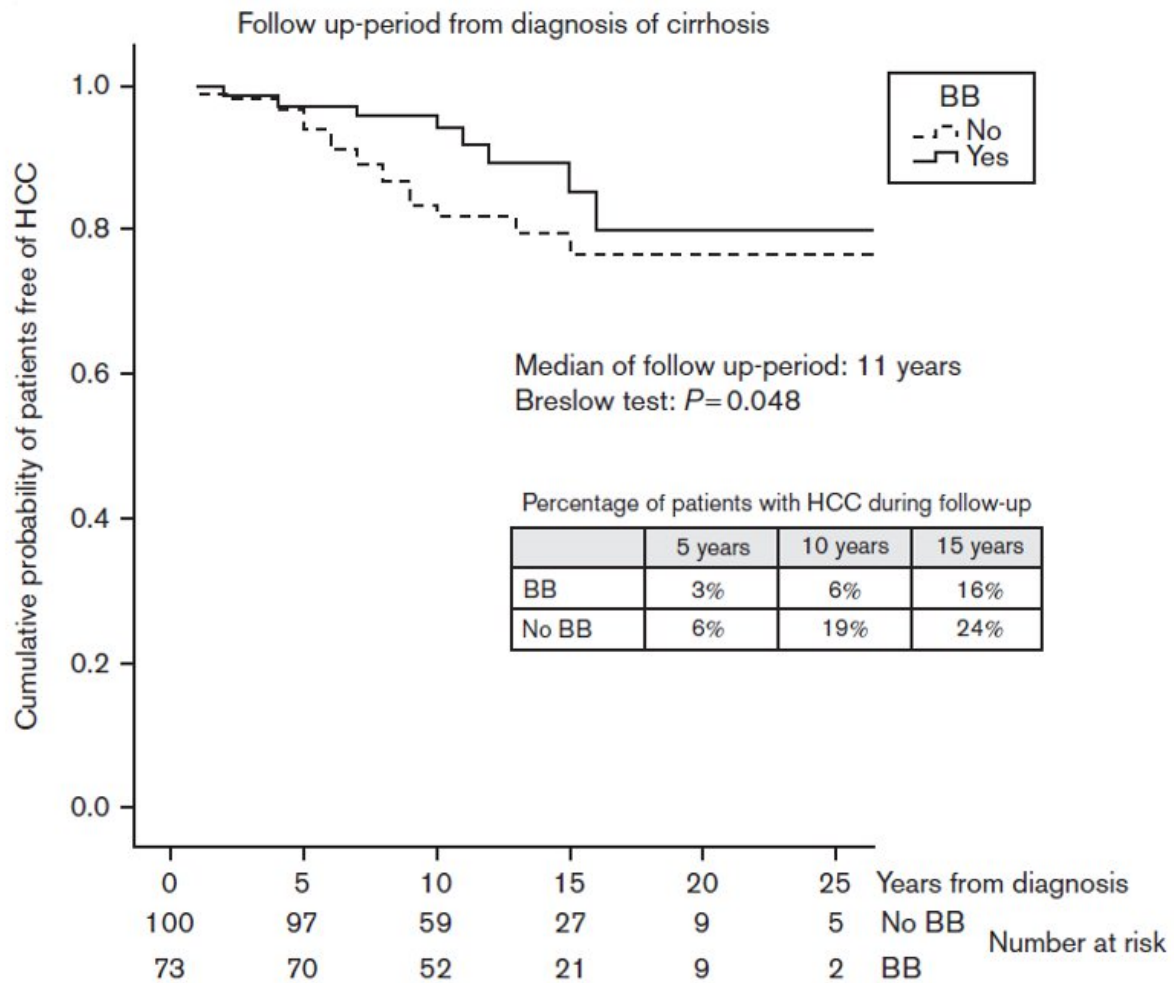


Figura 1. Probabilidad de supervivencia libre de hepatocarcinoma en función del tratamiento con BB

Existen otros estudios observacionales que encuentran también una asociación entre el uso de propranolol y una menor mortalidad en melanoma maligno avanzado [24] y cáncer de mama [25]. Un estudio realizado en Irlanda vinculando los registros de prescripción y de mortalidad nacionales encontró una menor mortalidad por cáncer de mama entre consumidoras de propranolol (beta-bloqueante no selectivo) pero no entre las tratadas con atenolol (beta-bloqueante específico del receptor beta 1) [26].

El conjunto de todos estos datos experimentales y de estudios observacionales en humanos sugieren un efecto de la actividad adrenérgica beta en la aparición y desarrollo de tumores aunque se desconoce el mecanismo por el que este efecto podría tener lugar. Recientemente, se ha sugerido que el posible efecto reductor de la incidencia y crecimiento del HCC descrito con los fármacos beta-bloqueantes no selectivos en los pacientes cirróticos podría ser consecuencia no sólo de los cambios en la actividad del sistema inmune y el consecuente bloqueo de parte de la acción del SNS, sino también del bloqueo de los receptores beta en mucosa y linfáticos intestinales y de cambios en la microbiota intestinal responsables de una menor frecuencia de episodios de translocación bacteriana y menor carga portal de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) con la consiguiente reducción en los fenómenos de inflamación tanto a nivel hepático como sistémico [27]. También se ha sugerido un posible efecto consistente en una reducción en la angiogénesis al inhibir el factor de crecimiento vascular endotelial [27].

Justificación del estudio

Los datos experimentales y los procedentes de estudios clínicos observacionales sugieren una importante implicación de la actividad del SNS y de sus efectos sobre la actividad del sistema inmune en el desarrollo y progresión de los procesos tumorales. Esto es especialmente relevante en el caso de los pacientes cirróticos y su riesgo de desarrollo de HCC. Sin embargo, no se conoce el o los mecanismos por el que estos efectos tienen lugar ni como la evolución temporal de los cambios en los sistemas inmune y SNS en relación a los procesos inflamatorios, incluyendo los episodios de translocación bacteriana, y de desarrollo de fibrosis que tienen lugar en el paciente cirrótico se traducen en último término en el desarrollo de HCC. Caracterizar este proceso es el objetivo principal del presente estudio.

Objetivos

Principal: identificar los cambios del sistema inmune (citoquinas pro y anti-inflamatorias) y del sistema nervioso simpático (catecolaminas y actividad de los receptores adrenérgicos de las células inmunes circulantes) que ocurren en los pacientes cirróticos a lo largo del tiempo y su posible asociación con la aparición de HCC

Secundarios:

1 - comparar el grado de activación del sistema inmune y del sistema nervioso simpático entre pacientes cirróticos a los que se diagnostica durante su seguimiento un HCC con pacientes cirróticos de características clínicas y demográficas parecidas y mismo tiempo de seguimiento sin HCC

2 - comparar el grado de activación del sistema inmune y del sistema nervioso simpático en función de que reciban o no tratamientos que interfieran con la actividad del SNS, como los fármacos beta-bloqueantes no selectivos, y la evolución a empeoramiento de la cirrosis y/o HCC

3 - comparar el grado de activación del sistema inmune y del sistema nervioso simpático en pacientes cirróticos dependiendo de que presenten o no fragmentos de ADN bacteriano y/o endotoxina circulante en sangre y la evolución a empeoramiento de la cirrosis y/o HCC.

Metodología

Diseño: estudio observacional prospectivo de cohortes

Sujetos de estudio: se incluirán secuencialmente pacientes cirróticos seguidos en la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante en el programa de detección temprana de HCC y que acepten participar en el estudio firmando el correspondiente consentimiento informado.

Nº pacientes a incluir en el estudio: de acuerdo con el número de pacientes que son seguidos en el programa de detección temprana de HCC de la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante (unos 45-50 nuevos pacientes cada año) se considera un número factible la inclusión de 100 pacientes al inicio del estudio entre los ya incluidos en el programa de screening en el momento actual y de 35 nuevos casos (asumiendo un 20% de negativas a participar en el estudio y/o de pérdidas) en cada uno de los 3 años del estudio hasta completar una cohorte de 200 pacientes. Asumiendo una incidencia anual de HCC mínima en esta cohorte de pacientes del 2% en 3 años se producirían 9-12 HCC. En todos los trabajos previos de nuestro grupo se ha identificado que entre un 35-10% de los pacientes, dependiendo de que tengan o no ascitis u otros factores favorecedores presentan fragmentos circulantes de ADN bacteriano en sangre. Igualmente, se estima en torno al 25-30% el porcentaje de pacientes de esta cohorte en tratamiento con beta-bloqueantes. Por todo ello, se espera reclutar un mínimo de 20 pacientes que en algún momento en los 3 años del estudio presenten fragmentos circulantes de ADN bacteriano y/o endotoxina y 50-60 pacientes que sean tratados con un beta-bloqueante no selectivo.

Inclusión y seguimiento de los pacientes: Los pacientes se incluirán en el estudio tras la firma del consentimiento informado y a partir de ese momento y coincidiendo con la extracción analítica que se les realiza cada 6 meses como parte del seguimiento del programa de detección temprana de HCC se separará una alícuota de suero y células para el estudio. Este procedimiento se realizará mientras los pacientes permanezcan en el programa de detección precoz de HCC. A su vez se recogerán en cada visita los datos clínicos, analíticos y de imagen indicativos de la evolución del paciente que se registrarán en el cuaderno de recogida de datos. El manejo y almacenaje de las muestras biológicas del estudio seguirá lo dispuesto en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica. En la figura 2 se resumen los procedimientos a seguir durante el estudio.

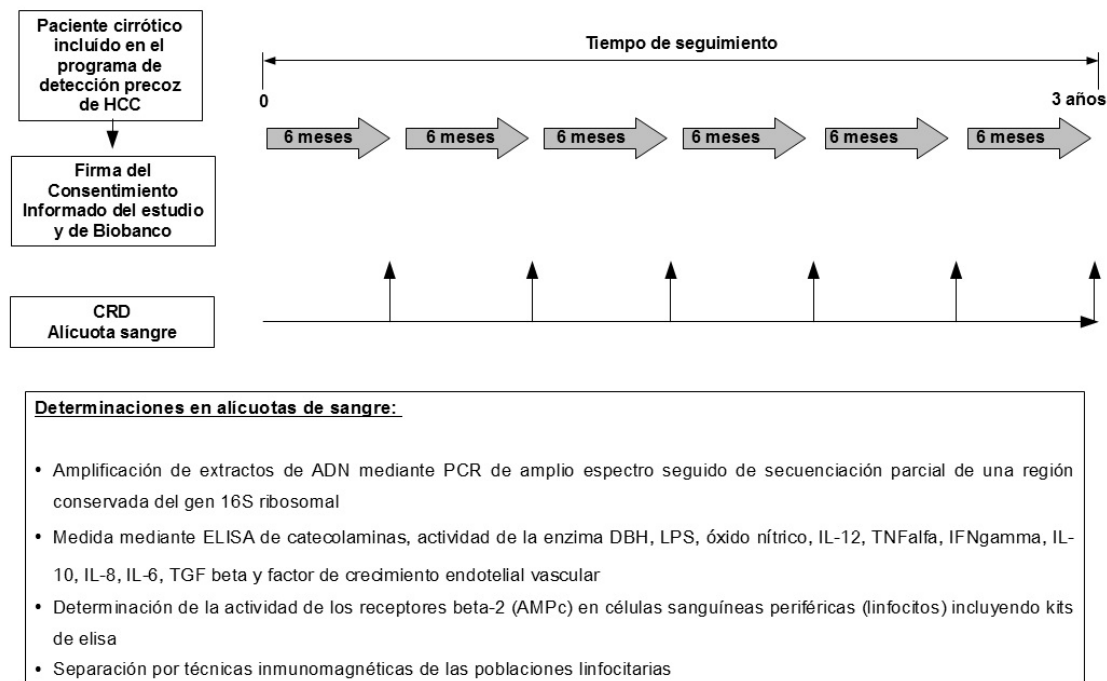


Figura 2. Procedimientos y cronograma a seguir durante el estudio

Variables: En cada muestra sanguínea se procederá al inmunofenotipado mediante citometría de flujo (Las determinaciones se realizarán en un FACSCanto de Becton Dickinson) para a continuación proceder a separar mediante técnicas inmunomagnéticas (Miltenyi, MACS) las poblaciones leucocitarias en linfocitos T citotóxicos (CD3, CD8) y células NK (CD16). En cada una de las poblaciones separadas se estudiará la funcionalidad de la vía de señalización receptor beta-2 - proteína G - adenilato-ciclasa mediante la producción de AMPc en respuesta a un agonista beta-2 adrenérgico en presencia y en ausencia de propranolol (método desarrollado por nuestro grupo). En esta muestras se cuantificará la expresión de los receptores beta-adrenérgicos mediante la cuantificación del ARN mensajero.

La alícuota de plasma se usará para la determinación de las concentraciones de catecolaminas plasmáticas (adrenalina, noradrenalina y dopamina; medidas mediante ELISA: kit 3CAT-Research ELISA de LDN), de la actividad de la enzima dopamina-beta-hidroxilasa (DBH), de la presencia de fragmentos bacterianos de ADN circulantes y su posterior secuenciación (Los extractos de ADN serán amplificados mediante PCR de amplio espectro seguida de secuenciación parcial de una región conservada del gen 16S ribosomal siguiendo metodología previamente descrita por nuestro grupo), lipopolisacárido (LPS), óxido nítrico, citoquinas pro y anti-inflamatorias y pro-fibrogénicas (IL-12, TNF-alfa, IFN-gamma, IL-10, IL-8, IL-6, TGF beta) y el factor de crecimiento endotelial vascular que se medirán mediante Kits de Elisa comerciales.

Además de las variables experimentales coincidiendo con la obtención de la muestra plasmática se obtendrá de la historia clínica de cada paciente las siguientes variables:

a) Datos demográficos, clínicos y analíticos del paciente: edad actual, edad de entrada en el programa de detección precoz del HCC, sexo, etiología de la cirrosis, Child-Pugh actual, Child-Pugh en el momento de la inclusión en el programa de detección precoz del HCC, Meld, antecedentes de ascitis,

encefalopatía y sangrado gastrointestinal, toma de beta-bloqueantes no selectivos, toma de norfloxacino o rifaximina para DIS, toma de otros fármacos, bilirrubina, albúmina, quick, INR, creatinina sérica, urea, glucosa, sodio, potasio, GOT, GPT, GGT, Fosfatasa alcalina, colesterol, triglicéridos, plaquetas, leucocitos, fórmula leucocitaria, hematíes, hemoglobina, hematocrito, alfa-fetoproteína.

b) Datos hemodinámicos: Tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, tensión arterial media, frecuencia cardíaca.

c) Resultados de otras pruebas que se realicen durante el seguimiento (pruebas de imagen, biopsia, etc).

Tras cada visita se identificará la presencia o no de HCC (aquellos pacientes a los que se diagnostique de HCC finalizarán el estudio y su última muestra será la coincidente con el diagnóstico del tumor).

Recogida de datos: Las variables anteriormente relacionadas serán recogidas por el investigador principal o sus colaboradores en el cuaderno de recogida de datos (CRD) diseñado a tal efecto y que se adjunta en el anexo. Se dispondrá de 1 CRD para cada paciente. El CRD y posterior procesamiento de los datos para su análisis será identificado por un código y dissociado de los datos del paciente para mantener la confidencialidad. La información del estudio será tratada de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

Análisis de datos: Las variables cuantitativas se describirán como media \pm DS y las cualitativas como frecuencias o porcentajes. Para el análisis las muestras de los pacientes se emparejarán en función del tiempo del paciente en el programa de detección precoz de HCC de forma que la muestra 1 será la correspondiente a un paciente que lleve 6 o menos meses en el programa, la 2 cuando lleve entre 6 y 12 meses en el programa y así sucesivamente. En un seguimiento de 3 años tendremos 6 puntos de corte o de análisis. En cada punto de corte se realizará un análisis de homogeneidad entre grupos de las variables clínicas y demográficas y en caso de existir diferencias significativas se procederá a realizar un análisis de datos apareados en base a la puntuación de propensión.

Las diferencias entre grupos (HCC vs no HCC; presencia vs. ausencia de DNA bacteriano; tratamiento con o sin beta-bloqueantes) se estudiarán mediante un test de ANOVA con corrección para comparaciones múltiples en el caso de variables cuantitativas y mediante el test de la chi-cuadrado para las variables cualitativas. Se explorará mediante análisis de correlación las posibles asociaciones entre las variables cuantitativas recogidas. En el caso de las variables experimentales que muestren diferencias significativas entre alguno de los factores arriba indicados y/o correlaciones significativas con variables demográficas o entre ellas, se realizará un análisis multivariante de covarianza con el objeto de explicar la variabilidad y las posibles asociaciones de dichas variables. Todas las pruebas estadísticas serán de dos colas, y se considerarán significativos los valores de $p < 0,05$. Se usará el software R para los análisis.

Aspectos éticos del estudio: El estudio se someterá a aprobación por el Comité Ético para la Investigación del Hospital General Universitario de Alicante

Limitaciones del estudio: El estudio es observacional, prospectivo, de inclusión secuencial de pacientes y por tanto no está exento de sesgos.

El sesgo de selección intentará controlarse tratando de proponer la participación en el estudio a todos los pacientes que cumplan los requisitos para entrar en el mismo. Para controlar la magnitud posible de este sesgo se recogerá el número de potenciales pacientes excluidos y las razones de dicha exclusión (incluida la negativa a participar en el estudio).

El momento de la obtención de las muestras y de la determinación de los diferentes parámetros puede influir en la variabilidad de los resultados lo que se pretende controlar analizando los datos en función del tiempo que cada paciente esté en el programa de detección de HCC.

La validez de las muestras de sangre para el estudio de las poblaciones linfocitarias es dependiente del número de células obtenido.

Resultados

Se incluyeron un total de 187 pacientes cirróticos (128 tratados con BB y 59 no tratados con BB). Las características de estos pacientes en el momento de su inclusión en el estudio se muestra en la tabla 1, en la que se han resaltado en rojo las diferencias significativas entre los pacientes de ambos grupos que muestran claramente que los pacientes tratados con BB con más frecuencia tenían varices esofágicas, menores cifras de plaquetas y albúmina (indicativas de mayor presión portal) y recibían más comedicaciones como inhibidores de la bomba de protones (IBP), diuréticos o estatinas. Estas diferencias basales se controlaron mediante un pareamiento por puntaje de propensión como se había previsto en el protocolo del estudio. Tras dicho ajuste quedaron un total de 111 pacientes no tratados y 46 tratados con BB.

Tabla 1. Características de los pacientes

Variable	No BB	BB	p
N	128	59	
Edad	60,3 ± 9,6	61,4 ± 8,9	0.477
Sexo (H/M) %	66/34	68/32	0.794
Etiología (OH/OH+virus/virus/otras) %	40/10/34/16	36/16/30/18	0.238
Child-Pugh (A/B/C) %	81/15/4	73/22/5	0.501
Ascitis (No/Si) %	96/4	91/9	0.184
IBPs (No/Si) %	73/27	58/42	0.031
Diureticos (No/Si) %	73/27	53/47	0.007
Estatinas (No/Si) %	89/11	78/22	0.045
Metformina (No/Si) %	85/15	88/12	0.584
Varices (No/Si) %	55/45	34/66	0.006
Plaquetas	135 ± 62	113 ± 58	0.028
Quick	79 ± 18	74 ± 15	0.062
Albúmina	3.8 ± 0.5	3.5 ± 0.6	0.016

En total, se detectó fragmentos de ADN bacteriano en un 24% de los pacientes (37 pacientes) siendo este porcentaje menor en los pacientes no tratados con BB (21%) que en los tratados con BB aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística (30%; $p=0.202$).

La actividad de los sistemas inmune y SNS presentó diferencias entre los pacientes tratados y no tratados con BB y también en función de la presencia o ausencia de ADN bacteriano circulante en sangre. En la tabla 2 se aprecia como el TNF-alfa aumentó en respuesta a la presencia de ADN bacteriano independientemente del tratamiento con BB. Por otro lado, las concentraciones de TGF-beta 1 estaban significativamente reducidas en los pacientes tratados con BB independientemente de la presencia o ausencia de ADN bacteriano. Entre los pacientes no tratados con BB las concentraciones de noradrenalina no se incrementaron en respuesta a la presencia de ADN bacteriano con la misma intensidad que la observada entre los pacientes tratados con estos fármacos.

En conjunto estos datos muestran que el bloqueo crónico de la activación del SNS (medida por las concentraciones de noradrenalina) por los fármacos BB modifica la respuesta inmune que se produce en los pacientes cirróticos en respuesta a la presencia de PAMPs como el ADN bacteriano (aumento de TNF-alfa). Además, el tratamiento con BB se asocia a concentraciones menores de TGF-beta1, un conocido factor pro-fibrogénico y modulador de los procesos tumorales.

Tabla 2. Concentraciones de citoquinas y catecolaminas que fueron diferentes en función del tratamiento con BB y la presencia o ausencia de ADN bacteriano

	Pacientes no tratados con BB (N=111)			Pacientes tratados con BB (N=46)		
	TNF-alfa (pg/mL)	TGF-beta1 (pg/mL)	Noradrenalina (pg/mL)	TNF-alfa (pg/mL)	TGF-beta1 (pg/mL)	Noradrenalina (pg/mL)
ADN bacteriano NO	0.92±0.42	783±437	765±735	0.99±0.43	596±308 &	763±590
ADN bacteriano SI	1.03±0.37 *	846±803	592±341 *	1.30±0.70*	614±394 &	1365±639 *&

Datos son media±ds. * $p < 0,05$ vs ADN bacteriano NO; & $p < 0,05$ vs pacientes no tratados con BB.

Las menores concentraciones plasmáticas de TGF-beta 1 observadas en los pacientes tratados con BB se acompañaron de una menor cantidad de células NKT circulantes que la observada en los pacientes no tratados con BB (124 ± 24 vs. 49 ± 10 ; $p=0,046$), sin que se produjeran diferencias significativas en las cifras de células NK (237 ± 26 vs. 262 ± 51 ; $p=0,64$) como se muestra en la figura 3.

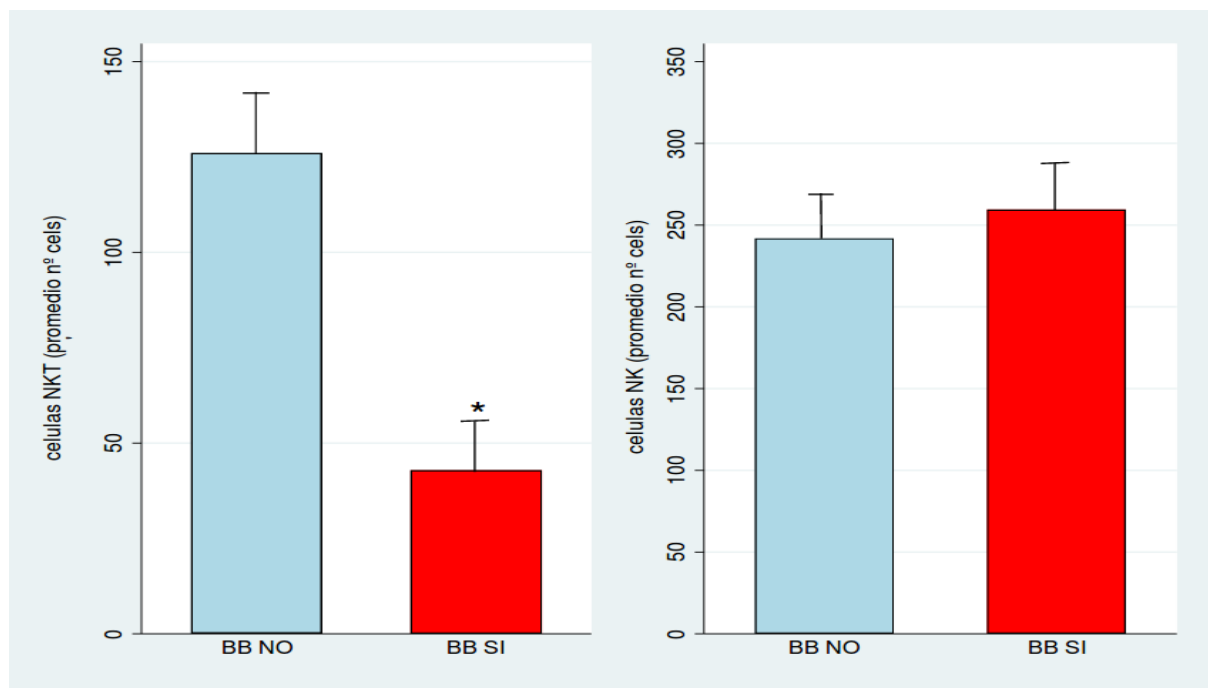


Figura 3. Número de células NK y NKT en pacientes cirróticos tratados y no tratados con beta-bloqueantes no selectivos (BB).

Esta reducción en las concentraciones de TGF-beta 1 y en las cifras de células NKT circulantes en los pacientes tratados con BB no se relacionaron de forma estadísticamente significativa ni con las variables clínicas y/o demográficas estudiadas, ni con las variables de inflamación medidas (citoquinas, óxido nítrico, I_{ps}) ni con las variables indicativas de la actividad del SNS (concentraciones de catecolaminas, concentraciones intracelulares de AMP cíclico en respuesta al estímulo beta adrenérgico o la expresión (ARNm) de los receptores adrenérgicos) lo que apunta a un mecanismo de acción de los fármacos BB sobre las células inmunes circulantes distinto al bloqueo de los receptores beta.

Los pacientes se han seguido una mediana de 834 días [min=12; max=1127], período durante el cual fallecieron 14 pacientes. La proporción de pacientes tratados con BB que fallecieron (8; 17%) fue mayor que la observada en los pacientes no tratados con BB (6; 5.4%) lo que puede explicarse por un mayor grado de hipertensión portal y mayor riesgo de descompensación y sangrado por varices. Por el contrario desarrollaron HCC en mayor número los pacientes no tratados con BB. Concretamente, desarrollaron HCC un total de 9 pacientes (mediana de tiempo hasta el desarrollo del HCC de 819 días [min=448; max=885], 7 no tratados con BB (6.3%) y 2 tratados con estos fármacos (4.3%; $p=0.479$).

Los 9 pacientes que desarrollaron HCC tenían desde el momento de su inclusión en el estudio concentraciones de TGF-beta 1 y cifras de células NKT significativamente menores que los mostrados por los pacientes que a lo largo de su seguimiento no desarrollaron un HCC como se aprecia en la figura 4.

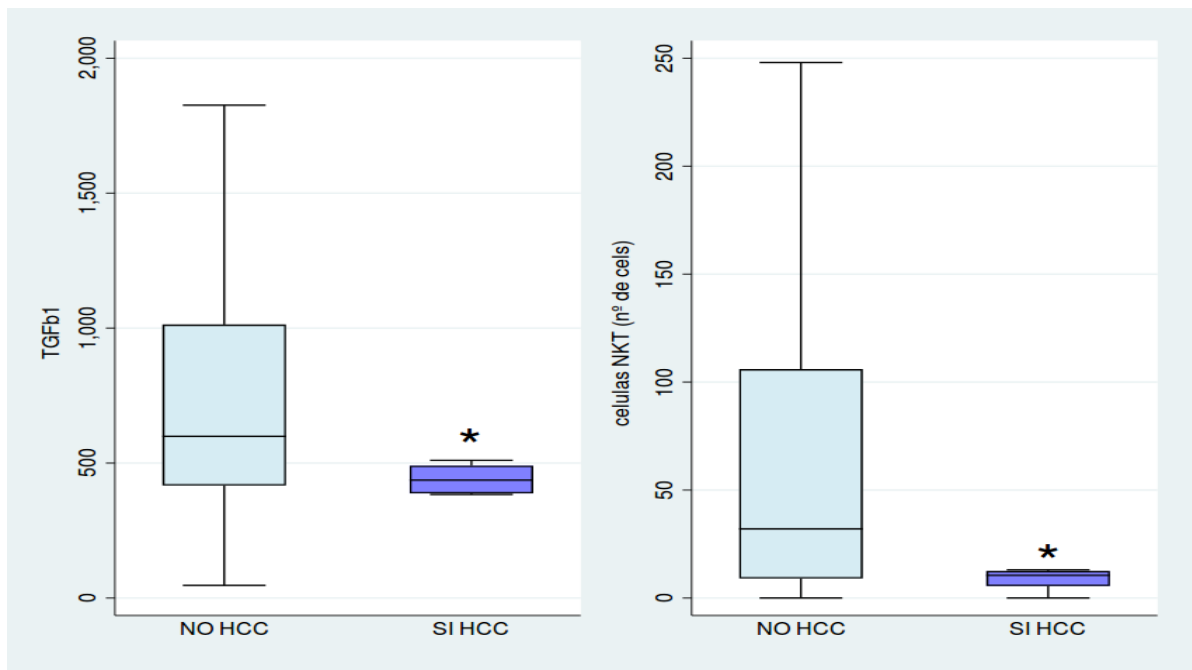


Figura 4. Concentraciones de TGF-beta 1 y número de células NKT en pacientes cirróticos en el momento de su inclusión en el estudio en función del desarrollo o no de un HCC durante los dos años de seguimiento.

Durante los 2 años de seguimiento de los pacientes se pudo constatar que las concentraciones de TGF-beta1 permanecían significativamente reducidas en los pacientes tratados con fármacos beta-bloqueantes como se aprecia en la Figura 5. Las cifras de células NKT circulantes se mantuvieron igualmente bajas durante el estudio en los pacientes que finalmente desarrollaron HCC.

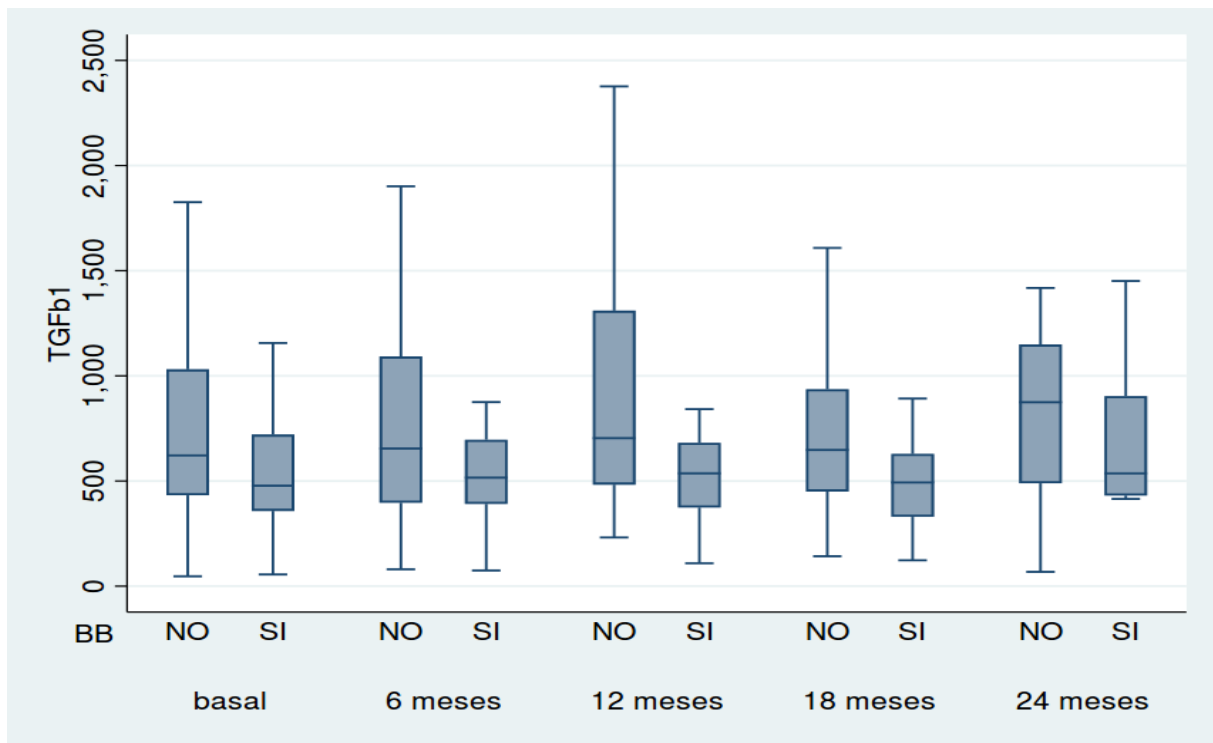


Figura 5. Concentraciones plasmáticas de TGF-beta 1 a lo largo del tiempo en pacientes cirróticos tratados y no tratados con beta-bloqueantes no selectivos.

Conclusiones y direcciones futuras

Los pacientes cirróticos tratados con fármacos BB de forma crónica desarrollan un menor número de HCC que los pacientes no tratados con estos fármacos a pesar de un grado más avanzado de hipertensión portal. Los fármacos BB modulan en estos pacientes la respuesta del SNS (concentraciones de noradrenalina) a la presencia en sangre de PAMPs como el ADN bacteriano lo que puede relacionarse con cambios en la regulación de la respuesta inmune. Por otro lado y sin una relación clara con otras variables indicativas de la actividad de los sistemas inmune y SNS, el tratamiento con estos fármacos se relaciona con menores concentraciones plasmáticas de TGF-beta 1 y un menor número de células NKT circulantes y estos efectos se mantienen en el tiempo mientras perdura el tratamiento beta-bloqueante.

Los pacientes que durante el seguimiento desarrollan un HCC tienen también crónicamente cifras menores de TGF-beta 1 y de células NKT circulantes. Esta última observación es difícil de interpretar puesto que sólo 2 de los 9 HCC que se desarrollaron estaban en tratamiento con BB por lo que nuestro grupo continúa con el seguimiento de los pacientes para detectar nuevos HCC entre los tratados y los no tratados con BB y poder analizar el efecto de estos fármacos sobre el TGF-beta 1 y las células NKT antes del desarrollo del HCC.

En conclusión, nuestros resultados muestran un efecto distintivo de los fármacos BB sobre las concentraciones de TGF-beta 1 y el número de células NKT circulantes, factores alterados en los pacientes que posteriormente desarrollan un HCC. El efecto de los BB sobre TGF-beta 1 y células NKT podría corresponder a un mecanismo nuevo distinto al efecto de bloqueo beta-adrenérgico.

Nuestro objetivo es analizar en futuros estudios este mecanismo y estudiar si estos cambios que hemos descrito a nivel sistémico se dan también a nivel hepático e influyen en el desarrollo del HCC para lo que precisamos recurrir a modelos experimentales celulares y animales.

Bibliografía

1. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 1992; 267: 1244–52.
2. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995; 332:1351–62.
3. Chrousos GP, Kino T. Interactive Functional Specificity of the Stress and Immune Responses: The Ying, the Yang, and the Defense against 2 Major Classes of Bacteria. *J Infect Dis* 2005;192: 551–5.
- 4 - Straub RH, Pongratz G, Weidler C et al. Ablation of the sympathetic nervous system decreases gram-negative and increases gram-positive bacterial dissemination: key roles for tumor necrosis factor/phagocytes and interleukin-4/lymphocytes. *J Infect Dis.* 2005; 192: 560-72.
5. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress system--organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation.* 2006; 13: 257-67.
- 6 - Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006; 43: S121-S131.
- 7 - Floras JS, Legault L, Morali GA, Hara K, Blendis LM. Increased sympathetic outflow in cirrhosis and ascites: direct evidence from intraneural recordings. *Ann Intern Med* 1991; 114: 373–80.

- 8 - Ramond MJ, Comoy E, Lebrec D. Alterations in isoprenaline sensitivity in patients with cirrhosis: evidence of abnormality of the sympathetic nervous activity. *Br J Clin Pharmacol.* 1986; 21: 191-6.
- 9 - Hernández FT, Zapater P, De-Madaria E et al. Functional status of beta-2-adrenoceptor in isolated membranes of mature erythrocytes from patients with cirrhosis and oesophageal varices. *Vascul Pharmacol.* 2006; 44: 464-8.
- 10 - Merli M, Lucidi C, Di Gregorio V, et al. The chronic use of beta-blockers and proton pump inhibitors may affect the rate of bacterial infections in cirrhosis. *Liver Int.* 2015;35:362-369.
- 11 - Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA, et al. Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2013;58:911-921.
- 12 - Mookerjee RP, Pavesi M, Thomsen KL, et al. Treatment with non-selective beta blockers is associated with reduced severity of systemic inflammation and improved survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol.* 2016;64:574-582.
- 13 - Gimenez P, Garcia-Martinez I, Francés R, et al. Treatment with non-selective beta-blockers affects the systemic inflammatory response to bacterial DNA in patients with cirrhosis. *Liver Int.* 2018 May 26. doi: 10.1111/liv.13890.
- 14 - Velázquez RF, Rodríguez M, Navascués CA et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2003;37(3):520
- 15 - Ripoll C, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G et al. Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J Hepatol.* 2009;50(5):923–8
- 16 - Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53(3):1020–2.
- 17 - Ramakrishna G, Rastogi A, Trehanpati N et al. From Cirrhosis to Hepatocellular Carcinoma: New Molecular Insights on Inflammation and Cellular Senescence. *Liver Cancer* 2013;2(3-4):367–83.
- 18 - Fujii T, Fuchs BC, Yamada S et al. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:79.
- 19 - Cole SW, Sood AK. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18(5):1201–6.
- 20 - Kassahun WT, Guenl B, Ungemach FR, Jonas S, Abraham G. Expression and functional coupling of liver β_2 - adrenoceptors in the human hepatocellular carcinoma. *Pharmacology.* 2012;89(5-6):313–20.
- 21 - Li J, Yang X-M, Wang Y-H et al. Monoamine oxidase A suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by inhibiting the adrenergic system and its transactivation of EGFR signaling. *J Hepatol.* 2014;60(6):1225–34.
- 22 - Nkontchou G, Aout M, Mahmoudi A et al. Effect of long-term propranolol treatment on hepatocellular carcinoma incidence in patients with HCV-associated cirrhosis. *Cancer Prev Res.* 2012;5(8):1007–14.
- 23 - Herrera I, Pascual S, Zapater P et al. The use of β -blockers is associated with a lower risk of developing hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2016;28(10):1194-7.
- 24 - Melhem-Bertrandt A, Chavez-Macgregor M, Lei X et al. Beta-blocker use is associated with improved relapse-free survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(19):2645–52.
- 25 - Barron TI, Connolly RM, Sharp L, Bennett K, Visvanathan K. Beta blockers and breast cancer mortality: a population- based study. *J Clin Oncol* 2011;29(19):2635–44.
- 26 - Ripoll C, Genescà J, Araujo IK et al. Rebleeding prophylaxis improves outcomes in patients with hepatocellular carcinoma. A multicenter case-control study. *Hepatology* 2013;58(6):2079–88.
- 27 - Thiele M, Wiest R, Gluud LL, Albillos A, Krag A. Can non-selective beta-blockers prevent hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis? *Med Hypotheses* 2013;81(5):871–4.

