
**EFFECTES DELS INHIBIDORS DE LA CICLOOXIGENASA EN
CÈL·LULES HEPÀTIQUES I EL SEU PAPER EN LA
INFLAMACIÓ I FIBROSI HEPÀTICA EXPERIMENTAL**

Anna Planagumà Ferrer

Introducció

1 INTRODUCCIÓ

1.1 INFLAMACIÓ

La inflamació és una reacció defensiva de l'organisme contra tot tipus de lesió provocada per un canvi extern o un dany tissular i que porta com a última instància la restauració estructural i funcional del teixit. Aquesta resposta requereix d'immunitat innata i, depenent dels casos, d'una resposta immune adaptada [1-3].

Els medis i els sistemes que provoquen la lesió cel·lular responsable de la resposta inflamatòria inclouen traumatisme mecànic (especialment aixafament), radiació (tèrmica, UV, radioactiva), lesió química directa (productes químics, càustics, corrosius), lesió secundària química o bioquímica (inhibidors metabòlics, anòxia), organismes invasius (virus, bacteries, paràsits) i, finalment, reaccions de tipus antígen-anticòs que constitueixen la preocupació principal [1].

Les reaccions inflamatòries generalment es divideixen en dos tipus: agudes i cròniques.

La inflamació aguda consisteix en una reacció de la microcirculació que es caracteritza pel moviment de les proteïnes sèriques i dels leucòcits des de la sang cap al teixit extravascular formant-se una gran concentració de cèl·lules en el focus inflamat. Aquest moviment és regulat per l'alliberament seqüencial de mediadors vasoactius i quimiotàctics, que contribueixen a propagar els cinc signes cardinals d'inflamació: calor, rubor, tumefacció, dolor i pèrdua de funció. Els quatre primers signes van ser descrits per primera vegada per Cornelius Celsus el segle I dC i el cinquè per Galeno el segle II dC [1,4] (**Figura 1**).

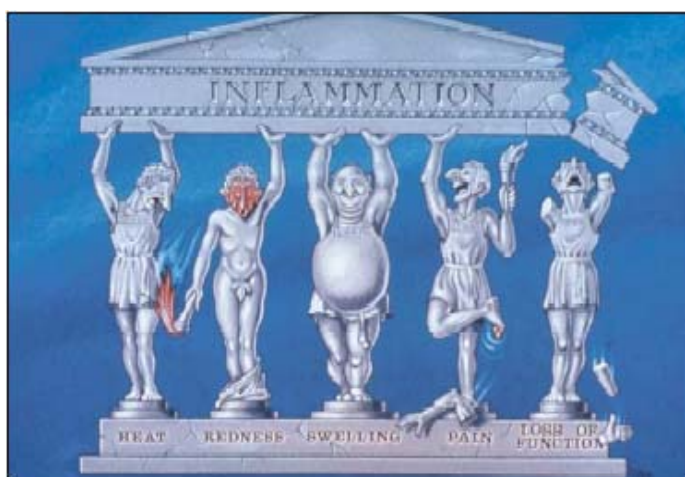


Figura 1. Il·lustració representativa dels cinc signes cardinals d'inflamació (Figura adaptada de [2]).

Microscòpicament la inflamació consisteix en un seguit d'etapes que inclouen (a) la dilatació d'arterioles, capil·lars i vèdules amb un increment de la permeabilitat i del flux sanguini, (b) l'exudació de fluids, incloent proteïnes del plasma i (c) la migració de leucòcits a dins del focus inflamatori [4].

Si l'estímul inicial d'un procés inflamatori no s'elimina per la mateixa reacció o per un control adequat, persisteix un estat constant d'inflamació generant-se una inflamació crònica. De manera característica, sobresurten els processos de neoformació del teixit conjuntiu, que es concreten en la formació de teixit de granulació, exudat, monocitosi amb moltes *cèl·lules gegants* multinuclears, limfòcits i acumulació de cèl·lules plasmàtiques. La invasió de teixit conjuntiu origina la formació de teixit fibrós (fibrosi) [1]. Per tant, la inflamació constitueix el procés central de la lluita contra patògens, però si no es dóna de forma ordenada i en el moment adequat en resulta una inflamació crònica que pot contribuir a desenvolupar diverses patologies. Per exemple avui en dia existeixen nombrosos estudis que relacionen la inflamació amb malalties com l'asma, l'artritis, l'arteriosclerosi, el càncer, l'Alzheimer, el Parkinson, l'esclerosi múltiple o el mateix envelliment cel·lular. També cal considerar altres malalties d'origen divers a on la fibrosi desencadenada després d'un procés inflamatori és la causa principal de la patologia. Exemples d'aquestes patologies són la cirrosi hepàtica (de tipus post-viral o alcohòlica), la fibrosi pulmonar idiopàtica, la fibrosi pulmonar induïda per bleomicina i el rebuig crònic d'aloempelt [5].

Fa més de 100 anys Metchnikoff, gràcies als seus estudis sobre la importància del sistema fagocític en la defensa de l'hoste i als seus treballs sobre la inflamació [6], va rebre el Premi Nobel i va establir les bases de la recerca en el camp de la inflamació.

Les malalties caracteritzades per la inflamació són una causa important de morbiditat i mortalitat en humans. La inflamació es dóna normalment per l'intent dels leucòcits de defensar l'hoste a davant d'invasors externs. Els passos centrals en la patogènesi de gairebé totes les formes d'inflamació consisteixen en l'acumulació de leucòcits i la seva subsegüent activació.

Així doncs, la inflamació és un procés de defensa de l'organisme, en la majoria dels casos, contra agents invasors externs però també poden ser agents interns com seria el cas de la renovació tissular i altres processos de regulació pròpia de l'organisme [1]; és aquí on radica el màxim interès ja que la mateixa inflamació és causa d'algunes reaccions no desitjades. Una absència d'inflamació arriba a comprometre a l'hoste. No obstant, un accés d'inflamació ja sigui secundari, p. ex. el reconeixement anòmal del teixit de l'hoste, o aliè, apaga el procés inflamatori normal i desencadena la malaltia inflamatòria [4].

Durant el procés inflamatori l'eliminació immunològica que es dóna del material aliè passa per una sèrie de passos integrats. Primerament el material ha de ser reconegut; per exemple, en el cas de l'antigen, primer és reconegut com a "aliè" per les immunoglobulines (IgGs, anticossos) o pels receptors dels limfòcits T, els quals després s'uneixen als seus determinants específics

(epítops). La unió d'un component del sistema immune a un antigen desencadena generalment l'activació d'un sistema d'amplificació de senyal, iniciant-se la producció de substàncies proinflamatòries. Aquests mediadors alteren el flux sanguini, incrementen la permeabilitat vascular, augmenten l'adhesió dels leucòcits circulants a l'endoteli vascular, promouen la migració dels leucòcits a dins del teixit i estimulen als leucòcits a destruir l'agent iniciador de tota la resposta inflamatòria. La destrucció real de l'antigen pel sistema immune té lloc mitjançant cèl·lules fagocítiques. Aquestes cèl·lules poden migrar lliurement o poden estar situades a llocs tissulars fixes formant part dels compostos del sistema mononuclear fagocític. Els macròfags i les cèl·lules relacionades (p. ex. les cèl·lules de Kupffer (KCs) o les cèl·lules sinovials de tipus A) són els components centrals d'aquest sistema. La destrucció d'antigens a fora del sistema fagocític mononuclear generalment té lloc en els espais intertissulars i és mitjançada pels leucòcits polimorfonuclears (PMNs), els neutròfils o els monòcits, els quals són reclutats de la sang circulant [4].

1.2 MEDIADORS D'INFLAMACIÓ

El procés inflamatori està regulat per l'alliberament seqüencial de mediadors vasoactius i quimiotàctics els quals contribueixen al desenvolupament dels signes cardinals d'inflamació: calor, rubor, tumefacció, dolor i pèrdua de funció.

Existeix un ampli conjunt de mediadors que coordinen les fases inicials d'inflamació. Aquests mediadors es poden classificar segons les seves propietats proinflamatòries o antiinflamatòries [2] (**Taula 1**).

S'han identificat una gran varietat de mediadors químics d'inflamació d'entre els quals cal destacar els mediadors solubles (histamina, citoquines, quimioquines, el factor de necrosi tumoral (TNF), factors de creixement, triptases i altres proteases), les espècies reactives de l'oxigen i els radicals derivats de gasos (p. ex. el peroxinitrat) [4,5]. A més, existeixen altres mediadors lipídics com és el cas del factor d'activació plaquetari (PAF), els lisolípid i molts eicosanoids derivats de l'àcid araquidònic (AA) que es classifiquen com a mediadors proinflamatoris entre els quals trobem les prostaglandines (PGs), els leucotriens (LTs) i altres compostos relacionats (**Taula1**). Les amines vasoactives, els eicosanoids lipídics, les citoquines i les quimioquines regulen de manera coordinada els canvis vasculars i el reclutament de les cèl·lules inflamatòries. Aquests mediadors causen vasodilatació (responsable de la calor i el rubor) i extravasació de fluids (causa de la tumefacció) [5].

Tipus de mediador	Proinflamatori	Antiinflamatori
Amines	Histamina, bradiquinina	Adrenalina, noradrenalina
Mediadors lipídics	PGE ₂ , PGI ₂ , LTB ₄ , LTC ₄	PGJ ₂ , PGA _{1/2} , lipoxines
Complement	C3a, C5a	Receptor C1q
Nucleòtids cíclics	GMPc	AMPc
Molècules d'adhesió	E-selectina, P-selectina, ICAM1, VCAM1	Integrina $\alpha_v\beta_3$, receptor TSP, receptor PS
Citoquines	TNF, IL-1 β , IL-6	TGF- β 1, IL-10
Quimioquines	IL-8, GRO/KC, MP1 α , MCP-1	-
Hormones esteroidees	-	Glucocorticoides

cAMP, adenosina 3,5 monofosfat cíclica; C3a, complement C3a; C5a, complement C5a; cGMP, guanosina 3,5 monofosfat cíclica; ICAM1, molècula d'adhesió intercel·lular 1; IL, interleuquina; LT, leucotriè; MCP1, proteïna quimiotàctica de monòcits 1; MIP1 α , proteïna inflamatòria de macròfags 1 α ; PG, prostaglandina; PS, fosfatidilserina; TGF- β 1, factor de transformació del creixement- β 1; TNF, factor de necrosi tumoral; TSP, trombospondina; VCAM1, molècula d'adhesió vascular cel·lular 1.

Taula 1. Mediadors inflamatoris (Taula adaptada de [2]).

Les molècules d'adhesió cel·lular faciliten el moviment de les cèl·lules inflamatòries des de la circulació perifèrica al lloc d'inflamació. Les citoquines proinflamatòries, com és el cas del TNF i de la interleuquina (IL)-1 β , activen les vies de senyalització de les cèl·lules endotelials les quals regulen l'expressió de les molècules d'adhesió que inicien la captura dels leucòcits circulants [4,7].

Durant el 1950 i el 1960 es van realitzar diversos estudis que van identificar diferents mediadors antiinflamatoris endògens que contraresten el trasvassament vascular, com és el cas de l'adrenalina, la noradrenalina i la 5-hidroxitriptamina. L'adenosina monofosfat cíclica (AMPc) intracel·lular, un segon missatger induït per diferents hormones, mediadors inflamatoris i citoquines, disminueix l'activació leucocitària. Un augment dels nivells intracel·lulars de AMPc que es dona com a resultat de la inhibició del sistema enzimàtic responsable del seu catabolisme (la inhibició de la fosfodiesterasa), disminueix tant la inflamació immune com la no immune *in vivo* i suprimeix també diferents processos cel·lulars *in vitro*, incloent l'alliberament immunològic d'histamina i de LTs per part dels mastòcits, monòcits i neutròfils; d'enzims lisosomàtics i d'espècies reactives de l'oxigen per part dels neutròfils; i de citoquines i d'òxid nítric (NO) per part dels macròfags [8].

S'ha vist que els mediadors inflamatoris s'alliberen de forma seqüencial al llarg del procés inflamatori. Estudis realitzats en models animals d'inflamació aguda han permès observar els mediadors associats a cada una de les fases d'inflamació (**Figura 2**). Les amines vasoactives i els mediadors lipídics promouen la formació d'exudat i/o edema; aquesta fase és seguida per l'expressió de citoquines i quimioquines que activen l'endoteli i faciliten la migració leucocitària

(neutròfils). Finalment, els mediadors lipídics antiinflamatoris, com és el cas de les LXs i les PGs ciclopentanones, atenuen la migració cel·lular i promouen l'apoptosi i l'aclariment leucocitari del focus inflamatori. La fagocitosis de les cèl·lules apoptòtiques per part de les cèl·lules mononuclears promou l'alliberament posterior de més mediadors antiinflamatoris: el TGF- β 1, BAX i BCL-2 associats a proteïna X [2] (**Figura 2**).

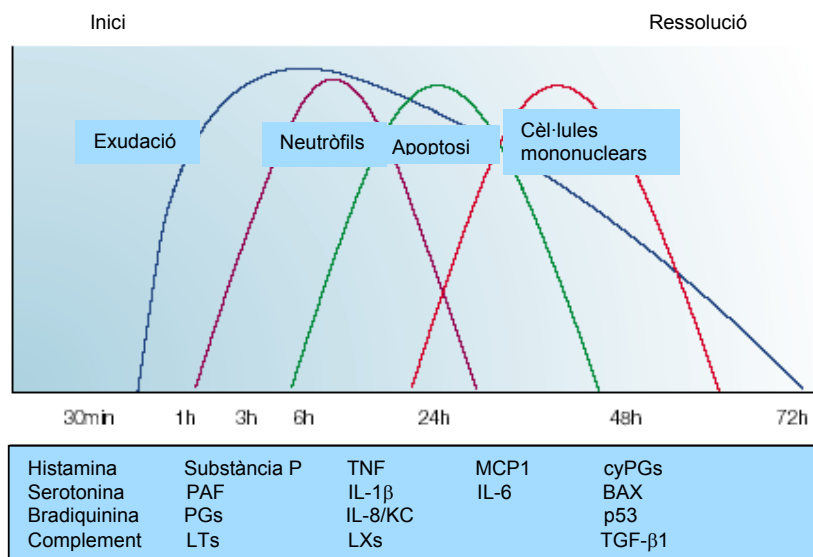


Figura 2. Alliberament seqüencial de mediadors al llarg del procés inflamatori (Figura adaptada de [2]).

A continuació es descriuen amb més detall els mediadors d'inflamació solubles i cel·lulars segons *Gallin JI et al.* [4].

1.2.1 MEDIADORS SOLUBLES D'INFLAMACIÓ

1.2.1.1 Immunoglobulines

Les IgGs o anticossos juguen un paper important tant en la iniciació com en la perpetuació de la reacció inflamatòria. Les principals vies per complimentar aquesta funció involucren l'activació del sistema del complement i l'activació dels leucòcits a través del complex antigen-anticòs [9].

Les IgGs poden ser fragmentades per la papaïna en tres fragments diferents: dos fragments Fab, que consisteixen en una cadena lleugera i el domini amino-terminal de la cadena pesada

(fragment Fd), i un fragment Fc que conté el domini carboxi-terminal de la cadena pesada [10]. L'activitat biològica de les IgGs es divideix en dues categories anomenades funció primària i secundària. La funció primària es localitza en el fragment Fab i consisteix en la unió específica a l'antigen. La funció secundària o les funcions efectores són mitjançades per la porció constant de la cadena pesada, particularment pel fragment Fc. S'ha demostrat que és aquest fragment Fc el que determina la vida biològica mitja d'una classe d'anticòs, i també el lloc on es secreten els anticòs (a la saliva, a les llàgrimes, etc.) o si activen el sistema del complement i s'uneixen a receptors de membrana cel·lular (receptors Fc, FcR) [11]. Els anticòs poden causar inflamació quan activen el sistema del complement i s'uneixen al FcR dels leucòcits per induir en aquestes cèl·lules l'alliberament de mediadors. Depenent del tipus d'anticòs, el complement pot ser activat o bé per la via clàssica o per l'alternativa.

1.2.1.2 Sistema del complement

La via del complement és la responsable de desencadenar els processos inflamatoris i constitueix una peça integral en la defensa de l'hoste contra les infeccions. El sistema del complement es compon de vint o més proteïnes plasmàtiques amb diferents activitats biològiques: la inducció de la resposta inflamatòria i la promoció de la ingestió, matança i lisi dels microorganismes. Aquestes proteïnes inclouen els components de la cascada proteolítica limitada, els components terminals que s'uneixen per formar el complex d'atac a membrana (MAC), les proteïnes reguladores i els receptors cel·lulars. A més a més, hi han diferents receptors de superfície cel·lular que presenten especificitat de lligant pels productes de reacció del complement els quals s'expressen en les cèl·lules inflamatòries i les cèl·lules del sistema immunitari. El paper que juga el complement durant la inflamació i el dany tissular va resultar ser aparent a través d'investigacions clíniques i mitjançant el descobriment que la patogènesi de certs models de malaltia experimental era dependent de complement [12].

Els processos de defensa de l'hoste que són dependents o modificats per l'activació del complement inclouen l'opsonització i la fagocitosi de microorganismes i de substàncies foranes, el reclutament i l'activació de cèl·lules actives immunològiques als llocs d'inflamació, el processament i l'aclarament dels complexos immunes i la lisi directa de molts tipus de dianes com són els virus encapsulats, les bacteries gram-negatives i les cèl·lules eucariotes reconegudes com a foranes per l'hoste [12].

El sistema del complement comprèn dues vies d'activació: la via d'activació clàssica i l'alternativa. La via alternativa constitueix el component humoral de la defensa natural contra infeccions que poden operar sense la participació d'anticòs. En canvi, la via clàssica d'activació del complement és un mediador de la resposta específica a anticòs; amb poques

excepcions, es desencadena per la unió de l'antigen a les molècules d'anticòs. Les dues vies produeixen el trencament i l'activació de C5 i d'aquesta manera l'assemblatge del MAC. El MAC, a través del seu lloc d'unió estable a membrana, s'uneix fortament a les membranes diana permetent la interacció hidrofòbica amb la bicapa lipídica [12].

L'activació del complement, tant per la via clàssica com per l'alternativa, porta a la generació de productes que no només ajuden al manteniment de les defenses normals de l'organisme sinó que també actuen com a mediadors d'inflamació i dany tissular. Respecte a les defenses de l'hoste i a la inflamació, els productes més importants del complement inclouen tant els fragments llargs de C3 amb activitat opsònica, com també pèptids de baix pes molecular (derivats de C3 i C5) que presenten activitat anafilatòxica i estimulen directament els leucòcits [12].

Els pèptids derivats de C5, per exemple, han estat detectats en fluids sinovials de pacients amb artritis reumatoides [13] com també en les capes dèrmiques de pacients amb psoriasi i dermatitis pustular inflamatòria [14].

1.2.1.3 Eicosanoids

Els eicosanoids juguen un paper clau en diversos processos fisiològics i patològics modulant la iniciació, la progressió i la resolució de la resposta inflamatòria. Ja que estan considerats com els mediadors solubles d'inflamació més importants s'amplia la seva caracterització en l'apartat 1.3.

1.2.1.4 Factor d'activació de plaquetes

El factor d'activació de plaquetes (PAF) és un fosfolípid altament bioactiu que exerceix un ampli rang d'efectes biològics d'entre els quals cal destacar l'estimulació de l'adhesió cel·lular, la permeabilitat vascular, l'agregació plaquetària i la contracció del múscul llis. El PAF és alliberat generalment per les cèl·lules productores a l'espai extracel·lular i actua unint-se a receptors específics de les cèl·lules diana acoblats a proteïna G. No obstant, el PAF sintetitzat per cèl·lules endotelials activades es manté a la membrana cel·lular, on mitjança l'activació juxtacrina i l'adhesió subsegüent de les cèl·lules mononuclears de la sang.

El PAF a més de disposar de l'habilitat d'induir reaccions al·lèrgiques agudes i inflamatòries també regula els processos fisiològics i fisiopatològics (com la modulació cardiovascular, pulmonar i renal, la funció hepàtica, la neurofisiologia, la biologia tumoral i la fisiologia

reproductiva). A més cal destacar que el PAF reforça la conversió pro-adhesiva de l'endoteli, la qual facilita la migració dels leucòcits de la vasculatura al focus inflamatori [15].

1.2.1.5 Histamina

El 1911 Dale i Laidlaw van observar per primera vegada que l'histamina disposava de propietats vasoactives [16] però la seva associació a mastòcits tissulars no es va descriure fins el 1953 [17]. L'histamina que és alliberada per les cèl·lules cebades com a resposta a la presència d'antígens, de certs factors inflamatoris cel·lulars, d'opioides o d'estímuls físics, és capaç de causar vasodilatació amb la consegüent formació d'eritema, increment de la permeabilitat vascular (edema) i dolor. Així doncs, l'histamina pot produir tres dels cinc signes cardinals d'inflamació i desencadenar un increment de la permeabilitat vascular provocant un augment de la infiltració leucocitària en el focus inflamatori.

Està descrit que l'histamina també pot generar PGs. En concret, l'anafilaxi induïda per antigen en el pulmó humà provoca un increment d'histamina i també de $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 i TXB_2 [18].

Cal remarcar que l'histamina afecta al reclutament dels basòfils en el lloc d'inflamació de la mateixa manera que és quimiotàctica pels eosinòfils humans. A més l'histamina és capaç d'alterar la funció dels neutròfils humans [19].

1.2.1.6 Citoquines

Les citoquines són proteïnes de senyalització extracel·lular necessàries per la comunicació cèl·lula-cèl·lula a través de l'organisme. Aquestes proteïnes són produïdes per molts tipus cel·lulars i actuen unint-se a receptors específics de membrana de les cèl·lules receptores les quals indueixen vies de transducció de senyal que porten a l'activació d'una sèrie de mecanismes que afecten a les propietats funcionals d'aquestes cèl·lules [20].

La senyalització per citoquines juga un paper important tant en estat fisiològic com patològic. És important durant el desenvolupament prenatal i el creixement postnatal, la remodelació i el manteniment de cada teixit i òrgan, i és essencial durant la resposta inflamatòria i immune com també per la cicatrització de les ferides i la reparació de teixit. Per tant, l'equilibri entre les diferents citoquines juga un paper clau en la regulació de les funcions cel·lulars importants com són la migració, la proliferació i la síntesi de matriu durant el procés inflamatori.

Les citoquines constitueixen un grup ampli de molècules (n'existeixen més de 30 tipus diferents) que es classifiquen convencionalment segons la classe de molècula a què pertanyen: ILs, factor de necrosi tumoral, interferons (IFNs), factors estimuladors de colònia (CSFs), factors

de creixement i quimioquines [21]. De totes maneres depenent de l'objectiu de la classificació pot ser preferible distingir les citoquines depenent de si presenten accions proinflamatòries (incloent TNF, IL-12, IL-18 i $IFN\gamma$) o antiinflamatòries (incloent IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 i IL-13) i si són produïdes per les cèl·lules *T helper* tipus I (Th1; incloent IL-2, $IFN\gamma$ i TNF) o per les cèl·lules *T helper* tipus II (Th2; incloent la IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13). De totes maneres pot ser útil classificar les citoquines segons la seva funció principal, com per exemple aquelles amb propietats quimioattractants que causen la migració directa dels leucòcits [les quimioquines (incloent la MCP-1, RANTES, la MIP-1, IL-8 i IL-16)] o segons l'homologia de la seqüència del receptor (p. ex. aquelles que utilitzen la proteïna de transducció de senyal gp130: IL-6, IL-11, IL-12, oncostatina M i cardiotrofina-1). No obstant, les funcions efectores de les citoquines disposen d'un grau substancial de pleiotropisme que fa que la majoria de les subdivisions tinguin un caràcter arbitrari [22].

La IL-1 constitueix un mediador clau de la resposta aguda causada per una invasió microbial, inflamació, reacció immunològica o dany tissular. Existeixen evidències que impliquen a la IL-1 com una de les primeres molècules més importants sintetitzades durant la resposta inflamatòria de fase aguda, cosa que indica que el seu efecte biològic es manifesta gairebé en tot tipus tissular i òrgan.

Una altra IL que intervé en els processos inflamatoris és la IL-2. El 1976 *Morgan et al.* van identificar un factor capaç de promoure el creixement *in vitro* de les cèl·lules T activades humanes [23]. A part de l'acció principal de la IL-2 de promoure el creixement de les cèl·lules T que expressen el receptor per aquesta limfoquina, la IL-2 té altres propietats biològiques; s'ha vist que també està implicada en la proliferació i la diferenciació de certes cèl·lules B activades [24,25] i també pot estimular la producció, per part de les cèl·lules T, del factor de creixement de les cèl·lules B i de $INF\gamma$ [26] independentment dels seus efectes sobre la proliferació de les cèl·lules T.

Els INFs van ser descoberts el 1950 i foren les primeres citoquines ben caracteritzades. El $INF\gamma$ va ser el primer producte de secreció de les cèl·lules T descobert i clonat. També s'ha vist que tant el TNF com el factor de creixement mieloide juguen un paper important en el procés de la resposta inflamatòria [20].

Les quimioquines són una família de citoquines quimiotàctiques que van ser identificades per primera vegada per la seva habilitat d'induir la migració de diferents tipus cel·lulars, particularment aquells d'origen limfoide. Les quimioquines poden ser activades per citoquines inflamatòries, factors de creixement i estímuls patogènics [27]. La via de senyalització de les quimioquines pot coordinar el moviment cel·lular que es dona durant la inflamació, com també el transport homeostàtic de les cèl·lules mare hematopoiètiques, limfòcits i cèl·lules dendrítiques. S'ha demostrat que les quimioquines conjuntament amb les selectines i les

integrines actuen com a senyals que dirigeixen la migració leucocitària de la mateixa manera que poden activar els leucòcits. Les quimioquines de baix pes molecular (proteïnes de 8-10 kDa) es classifiquen en quatre grups altament conservats (CXC, CC, C i CX3C) depenent de la posició de les dues primeres cisteïnes que es troben adjacents a l'extrem amino-terminal. S'han descobert més de cinquanta quimioquines fins al moment i existeixen almenys 18 receptors humans de quimioquines constituïts per set dominis transmembrana. Per exemple, CINC-1 (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1*) és un pèptid proinflamatori de 8-kDa membre de la família de les quimioquines CXC amb una activitat quimiotàctica potent cap a neutròfils [28,29]. CINC-1 és la part equivalent de rata de la IL-8 humana i/o el producte gènic de regulació del creixement α (GRO α) [28,29].

1.2.2 MEDIADORS CEL·LULARS D'INFLAMACIÓ

Una gran varietat cel·lular està implicada en la resposta inflamatòria i en l'alliberació de mediadors d'inflamació solubles, des de les cèl·lules fagocítiques (neutròfils, eosinòfils i macròfags) fins als mastòcits, basòfils, plaquetes, cèl·lules endotelials, fibroblastes, limfòcits i leucòcits.

La principal atenció en la investigació de la inflamació es centra en el reclutament de leucòcits de la sang [30]. No obstant, una resposta ràpida requereix de cèl·lules centinelles pre-estacionades en el mateix teixit. Els mastòcits i els macròfags són els responsables d'aquesta funció.

Quan es dona un traumatisme lleu amb infecció primer els mastòcits alliberen mediadors solubles i tot seguit trenquen les triptases dels mastòcits trenquen els receptors activats per proteases generant-se un extrem amino-terminal que desencadenarà la unió de proteïna G als receptors acoblats a mastòcits, terminacions nervioses sensorials [31], endoteli i neutròfils. Aquesta senyal, a més d'activar els mastòcits i les neurones, fa que l'endoteli es torni enganxós pels leucòcits i permeable a fluid, i promou que els leucòcits alliberin PAF. El PAF reforça la conversió proadhesiva de l'endoteli, la qual resulta en una migració de leucòcits de la vasculatura. Els neutròfils són parcialment activats pel TNF mentre que els mastòcits i altres neutròfils produeixen LTs, donant lloc a l'alliberament de petites quantitats d'elastasa. Tot aquest conjunt d'esdeveniments genera el trencament de la coberta del CD43 (la leucosialina) dels neutròfils, permetent a les seves integrines unir proteïnes de la matriu extracel·lular (MEC) [32]. La senyal binària de les integrines, després de l'estimulació per TNF, quimioquines o C5a desencadena la desgranulació i una explosió respiratòria massiva [33], resultant-ne un alliberament de proteïnases (p. ex. d'elastasa, serprocidines, catepsina G i proteasa 3), altres hidrolases, proteïnes antibiòtiques (p. ex. el factor d'increment de permeabilitat bacteriana, quatre

α -defensines, les tres serprocidines i els seus homòlegs proteolíticament inactius, les azurocidines) i oxidants (p. ex. el peròxid d'hidrogen, hipohalits i cloramines). Els oxidants activen les metaloproteases de matriu (MMPs) i inactiven els inhibidors tissulars de proteases (TIMPs) [34]. Totes aquestes accions promouen el trencament del teixit. Les MMPs trenquen el TNF dels macròfags de teixit com també dels monòcits i aquests són atrets quimiotàcticament del torrent sanguini cap al teixit per l'azurocidina [35]. El TNF, derivat dels macròfags i monòcits, i les quimioquines atrauen i activen més neutròfils. La combinació de TNF i quimioquines amb els mastòcits produeix PGE₂. Les defensines són derivades dels neutròfils i recluten limfòcits [36], mentre que els LTs ajuden a atraure les cèl·lules dendrítiques [37] presentadores d'antigen. Els limfòcits, conjuntament amb els productes microbials, activen als macròfags a secretar proteases, eicosanoids, citoquines, espècies reactives de l'oxigen i intermediaris de nitrogen.

1.3 SÍNTESI D'EICOSANOIDS

Els eicosanoids juguen un paper clau en la progressió i la resolució de la inflamació. Per aquest motiu estan considerats com els mediadors d'inflamació principals i seran objecte d'estudi al llarg del present treball.

Els eicosanoids són compostos derivats de l'oxigenació dels àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga. Es troben de forma general en tot el regne animal i també es troben, juntament amb les seves formes precursoras, en una gran varietat de plantes. Constitueixen una gran família de compostos que no només són altament potents sinó que també disposen d'un ampli espectre d'activitats biològiques. Degut a aquesta característica els eicosanoids, els seus receptors específics, els seus inhibidors i els seus precursors presenten un gran potencial terapèutic. No obstant, els eicosanoids tenen una vida mitja curta (de segons a minuts), per aquest motiu s'han sintetitzat diversos anàlegs estables per a utilitat clínica [38].

Els eicosanoids són compostos derivats de l'àcid araquidònic (AA) amb una varietat d'accions molt potents els quals estan implicats en inflamació, febre, dolor, coagulació, pressió sanguínia, secreció gàstrica, etc. Els eicosanoids poden actuar sobre el mateix teixit on es produeixen com si fossin hormones tissulars [39]. La seva disponibilitat és, per tant, depenent del subministrament d'àcids grassos essencials.

Estructuralment totes les cèl·lules de l'organisme disposen d'una membrana constituïda per una bicapa lipídica formada per fosfolípids i proteïnes de membrana que selectivament permeten el pas de nutrients i de metabòlits des de l'interior a l'exterior de la cèl·lula i viceversa. Quan un agent invasor provoca el trencament d'aquesta membrana per lesió mecànica o

invasiva, els fosfolípids de la membrana s'alliberen i són substrat de l'enzim fosfolipasa (PL) A₂ que genera el primer producte de la cadena de reaccions: l'AA (**Figura 3**).

L'alliberació d'AA dels fosfolípids de membrana constitueix el primer pas cap a la formació de PGs i LTs. Per tant, per l'acció dels enzims anomenats PLs (principalment per la PLA₂) s'allibera l'AA de la membrana (**Figura 3**).

Les PLA₂ són una superfamília de esterases que hidrolitzen l'enllaç èster de la posició sn-2 dels fosfolípids de la membrana cel·lular, alliberant l'àcid gras i el lisofosfolípid corresponent. Antigament les PLs es van classificar depenent de la seva localització i de la dependència a calci (Ca²⁺). D'aquesta manera es distingeixen:

- a) La PLA₂ de baix pes molecular (14kDa) de tipus I i II o també anomenada PLA₂ secretada (PLA₂S). Ambdues fosfolipases alliberen els àcids grassos de forma no selectiva.
- b) La PLA₂ citosòlica (PLA₂C) de més alt pes molecular (85 kDa). Aquesta fosfolipasa és depenent de Ca²⁺ i té preferència pels fosfolípids que presenten l'AA com és el cas de lafosfatidilcolina. La PLA₂C s'activa en presència d'hormones, neurotransmissors i factors de creixement translocant-se del citosol a la membrana.
- c) La PLA₂ independent de Ca²⁺ (PLA₂I) que es localitza de forma intracel·lular.

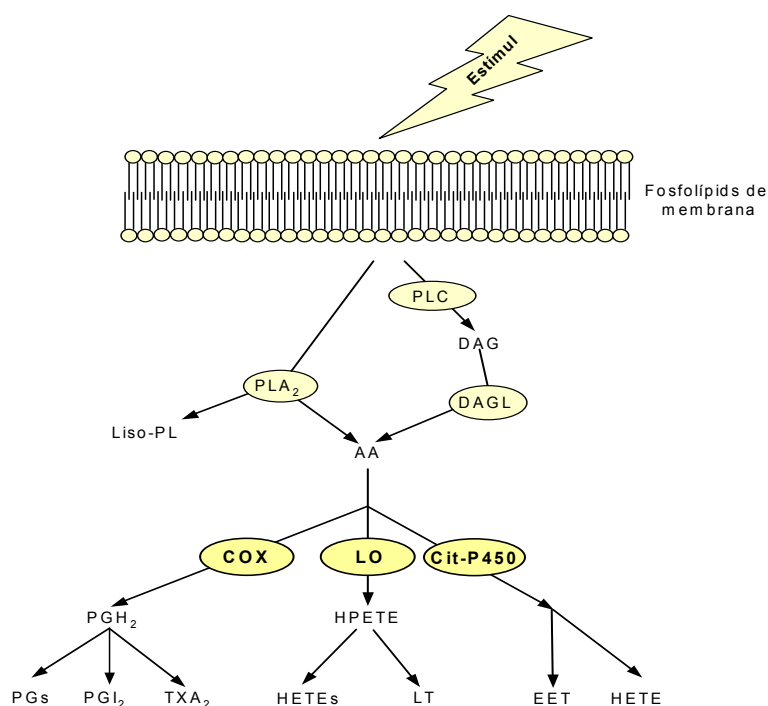


Figura 3. Metabolisme dels eicosanoids.

També l'AA es pot generar per altres vies les quals inclouen la via de la fosfolipasa C, que allibera diacilglicerol (DAG), o la via de la fosfolipasa D, que allibera àcid fosfatídic el qual pot ser metabolitzat per la fosfohidrolasa de l'àcid fosfatídic a DAG. La concentració d'AA cel·lular també pot augmentar de manera més secundària al inhibir-se la seva utilització en la reacció dels lisofosfolípids.

Actualment a causa de la complexitat de les noves PLs existeix una classificació de les diferents PLA₂ segons la seva seqüència de nucleòtids [40].

Fins al moment s'han descrit onze grups de fosfolipases (I-XI) les quals tenen la seva equivalència amb l'antiga classificació [41-43].

És la PLA_{2c} de 85 kDa la que subministra normalment l'AA per a la producció de PGs. La PLA₂ catalitza la hidròlisi dels glicerofosfolípids en posició sn-2 donant lloc a àcids grassos lliures i lisofosfolípids. Degut a què aquesta isoforma de PLA₂ requereix Ca²⁺ i calmodulina per la seva activació, s'ha considerat que és la PL i no la ciclooxigenasa (COX) el pas limitant en la producció de PGs [44].

L'AA és el precursor comú més important i més abundant d'una gran família de mediadors lipídics biològicament actius que es coneixen amb els nom d'eicosanoids. L'AA és un àcid gras poliinsaturat format per una cadena hidrocarbonada de 20 àtoms de carboni amb quatre dobles enllaços C20:4 (àcid *cis* Δ5,8,11,14-eicosatetranoic) que fan que sigui una estructura hidròfoba i fàcilment susceptible de ser oxidada.

La reacció de l'AA amb una molècula d'oxigen es pot donar de manera no enzimàtica contribuint a l'estrès oxidatiu mitjançant la formació d'isoprostans, o de manera enzimàtica a través de l'acció de tres tipus d'oxigenases:

- a) La COX
- b) La lipooxigenasa (LO)
- c) El citocrom P450

a) La COX converteix l'AA a PGG₂/H₂ gràcies a les activitats oxigenasa i peroxidasa de l'enzim. La PGH₂ actua com a precursora d'un ampli ventall de PGs i TXs d'entre els quals cal destacar la PGI₂, PGE₂, PGD₂, 15d-PGJ₂, 6-ceto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXA₂, TXB₂ (**Figura 4**).

A més, altres substrats diferents de l'AA, com és el cas de l'àcid docosahexanoic (DHA) i l'àcid eicosapentanoic (EPA), poden funcionar com a substrat per la síntesi d'una sèrie de noves molècules d'origen lipídic anomenades resolvines.

S'amplia la informació sobre la COX en el següent apartat 1.3.1.

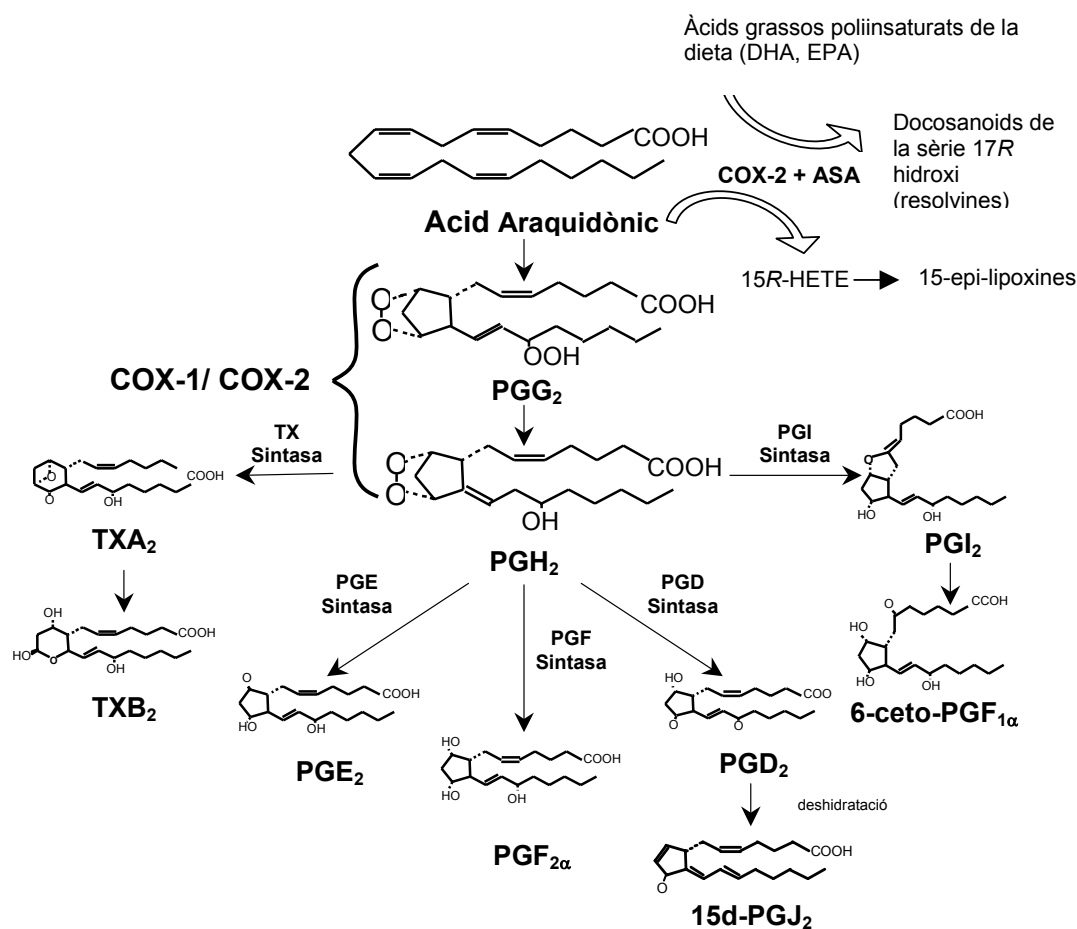


Figura 4. Via de la ciclooxigenasa.

b) La LO catalitza la reacció de síntesi de l'AA a àcid hidroperoxieicosatetranoic (HPETE) que és ràpidament convertit a àcid hidroxieicosatetranoic (HETE) precursor dels LTs i les LXs [38,45] (Figura 5).

Els mamífers disposen de la 5-, 12-, i 15-LO, anomenades així segons la seva capacitat d'introduir un oxigen molecular en una posició determinada de l'AA [46] (Figura 5). De la mateixa manera que succeïa amb els prostanoids, cada tipus cel·lular pot expressar diferents enzims lipooxigenàsics i, addicionalment, produir diferents metabòlits secundaris. Així, per exemple, a diferència de les cèl·lules PMNs humanes que presenten activitat 5- i 15-LO, les plaquetes mostren exclusivament activitat 12-LO i els eritròcits, malgrat no expressar 5-LO, sintetitzen LTB₄ a partir del LTA₄ alliberat pels neutròfils per acció de l'enzim LTA₄-hidrolasa [46,47].

Els LTs més investigats a fons són aquells que provenen de la 5-LO, la qual s'expressa en cèl·lules inflammatòries [polimorfonuclears (PMNs), basòfils, mastòcits, eosinòfils i macròfags]. Aquesta via és de gran interès ja que està associada amb l'asma i el xoc anafilàctic.

La 5-LO va ser per primera vegada descrita el 1976 per *Borgeat et al.* [48] com l'enzim catalitzador de la biosíntesi de potents eicosanoids bioactius. La 5-LO ha estat identificada com una proteïna citosòlica amb una massa de 78kDa, tot i que també ha estat localitzada al nucli [49]. El gen de la 5-LO té més de 82 kb de llargada i comprèn 14 exons separats per 13 introns [50]. Aquest enzim donarà lloc als productes de la sèrie dels LTs que constitueixen un grup de compostos derivats de l'AA amb activitats biològiques involucrades en el procés d'inflamació i en la hipersensibilitat immediata. Alguns LTs són quimiotàctics de neutròfils i arriben al lloc de la lesió per tal de neutralitzar als possibles agents invasors [1].

Com altres membres de la família de les LOs, la 5-LO és una dioxigenasa, catalitza la hidroperoxidació de l'AA donant lloc a la formació de l'àcid 5-S-HPETE. Consecutivament la reducció del 5S-HPETE comporta la formació, o bé de 5-HETE o bé de l'àcid 5,6-òxid-7,9-trans-11,15-*cis*-eicosatetranoic, més conegut com a LTA₄. El LTA₄ és un epòxid inestable que pot ser metabolitzat per tres enzims específics que produiran diferents productes bioactius. El primer d'aquests enzims és la LTA₄-hidrolasa que catalitza la hidròlisi del LTA₄ a LTB₄. El segon enzim, la LTC₄-sintasa o la glutatió S-transferasa, catalitza la conjugació del LTA₄ amb un glutatió tripeptídic generant LTC₄. El metabolisme del LTC₄ pot continuar gràcies a la degradació seqüencial del glutatió per part de les peptidases. Per l'acció d'una γ -glutamil-transpeptidasa es produeix el LTD₄. Finalment, l'acció d'una dipeptidasa sobre el LTD₄ provoca la pèrdua d'un residu de glicina que comportarà la formació del LTE₄ [46] (**Figura 5**). Aquests tres últims compostos que corresponen a la substància lenta de reacció de l'anafilaxi reben el nom de cisteïnil leucotriens (Cys-LTs) o peptidoleucotriens. El tercer enzim produeix LXA₄ i B₄ gràcies a l'actuació enzimàtica de la 12- o la 15-LO [51]. De forma similar a la de la 5-LO, es produeixen els àcids 12- i 15- HPETEs i 12- i 15- i HETEs.

L'activació de la 5-LO requereix de cofactors com adenosina trifosfat (ATP), Ca²⁺ i una proteïna de 18 kDa anomenada proteïna activadora de la 5-LO (FLAP) la qual facilita l'anclatge de l'AA a la 5-LO. Gràcies a aquests cofactors la 5-LO pot translocar-se a la membrana plasmàtica o al reticle endoplasmàtic on s'uneix a la FLAP que li facilita l'accés a l'AA lliure [52].

Els LTs regulen processos immunoinflamatoris. En aquest sentit, el LTB₄ indueix l'adhesió a endoteli; en leucòcits produeix una important resposta quimiotàctica i en neutròfils estimula l'agregació, la secreció d'enzims lisosomals i la generació de superòxid [46,47]. A més, el LTB₄ té la capacitat d'estimular l'activitat de la 5-LO augmentant els nivells de Ca²⁺ intracel·lular [53].

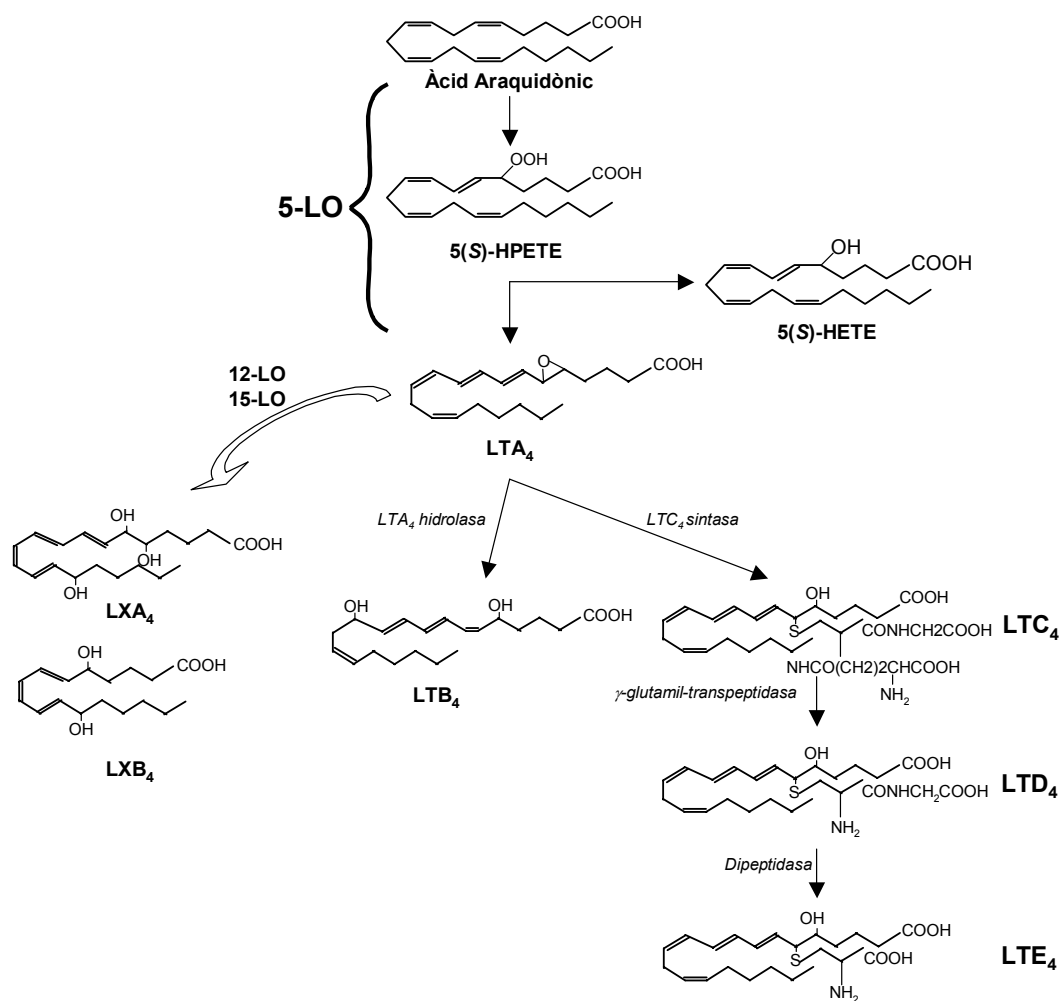


Figura 5. Via de la 5-lipooxigenasa.

La modulació de la resposta proliferativa en cèl·lules immunocompetents ha estat associada a l'actuació del LTB₄, possiblement per l'estimulació de la síntesi de la IL-1, -2 o -6 [47]. D'altra banda, els cys-LTs són principalment potents inductors de la contractibilitat de la musculatura llisa, el que es tradueix en accions bronco i vasoconstrictores, un augment de la permeabilitat vascular i una secreció de mucus a les vies aèries [46,47].

Els LTs generats davant un estímul són extrets al medi extracel·lular a on exerciran les seves accions fisiològiques a través dels receptors de superfície de les seves cèl·lules diana. Actualment s'han descrit receptors a la superfície dels neutròfils i eosinòfils amb alta i baixa afinitat pel LTB₄, alhora que pels LTs sulfopeptídics s'han identificat receptors amb molta variabilitat pel que fa a l'especificitat entre animals i humans [47]. Estudis recents, relacionen la

regulació de l'activitat inflamatòria amb la unió del LTB_4 al receptor activat per proliferadors peroxisomals ($\text{PPAR}\alpha$) [54]. La presència d'aquests receptors intranuclears activats pels eicosanoids permet relacionar les accions dels lípids bioactius amb mecanismes d'expressió gènica.

La inhibició de la 5-LO presenta un gran interès farmacològic, ja que amb la seva inhibició per un costat s'equilibra l'augment de la síntesi de LTs i per l'altre s'afegeixen els efectes beneficiosos de la disminució de quimiotaxis i de permeabilitat vascular. Actualment existeixen quatre propostes de fàrmacs inhibidors dels LTs [47] (**Figura 6**):

- Inhibidors de l'enzim 5-LO
- Inhibidors de la FLAP
- Antagonistes dels receptors dels LTs (LTB_4 i LTD_4)
- Inhibidors de la PLA_2

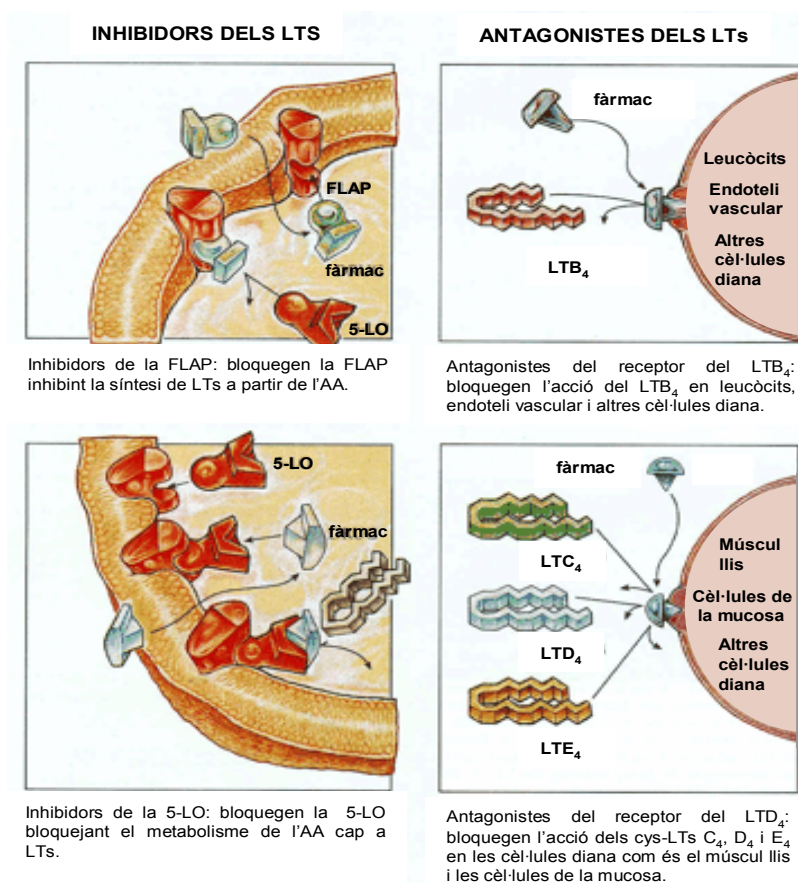


Figura 6. Inhibidors i antagonistes dels leucotriens (Figura adaptada de [47]).

Els inhibidors de la 5-LO són efectius contra els processos asmàtics, de rinitis i sinusitis al·lèrgica tot i que també hi han estudis que els relacionen com a preventius del càncer de colon [38].

c) La família d'enzims del citocrom P450 constitueix la última via majoritària del metabolisme de l'AA. Aquesta família d'enzims insereix un àtom d'oxigen en les diferents posicions de la molècula d'AA donant lloc als àcids epoxieicosatrienoics o 5-, 8-, 9-, 11-, 12-, i 15-HETEs [55,56].

1.3.1 VIA DE LA CICLOOXIGENASA

1.3.1.1 Expressió gènica

El gen de la COX es va purificar per primera vegada a partir de les glàndules vesiculars bovines [57] i l'enzim va ser clonat el 1988 per tres grups per separat [58-60]. El 1991 es va identificar una segona isoforma induïble de la COX que es va anomenar COX-2 [61,62]. Les dues isoformes de la COX, COX-1 i COX-2, estan codificades per gens diferents. A més, en humans els gens es localitzen en cromosomes diferents; el gen de la COX-1 es localitza en el cromosoma 9 [63] mentre que el gen de la COX-2 es localitza en del cromosoma 1 [64]. El gen de la COX-1 està constituït per onze exons i deu introns que recobreixen 22.5 kb d'àcid desoxoribonucleic (DNA) genòmic. La transcripció de la COX-1 dona lloc a un àcid ribonucleic missatger (mRNA) de 2.8 kb que codifica per uns sis-cents residus d'una proteïna de 67-72 kDa. Aquesta proteïna conté un pèptid senyal d'intercalació a la membrana i disposa de quatre possibles llocs de N-glicosilació. La majoria d'exons de la COX-1 estan conservats en la COX-2 a excepció de l'exó 2. El gen de la COX-2 és més petit (8.3 kb) degut a què està format per deu exons i disposa de dos introns de grandària més petita. La transcripció de la COX-2 dona lloc a un mRNA de 4.5 kb que codifica per una proteïna de 67-72 kDa [65,66].

1.3.1.2 Estructura proteica

Les COXs són proteïnes integrals de membrana, glicosilades, que es localitzen en el reticle endoplasmàtic i en la membrana nuclear. Es troben anclades a la membrana en forma de dues subunitats. La seqüència d'aminoàcids (aas) de la COX-2 presenta un 63% d'homologia amb la de la COX-1 a dins d'una mateixa espècie i les dues proteïnes catalitzen les mateixes reaccions i tenen constants cinètiques idèntiques de conversió de l'AA a PGs. Les diferències

més acusades es troben a nivell d'estructura primària mentre que les estructures terciàries i quaternàries són molt semblants. L'estructura tridimensional de la COX-1 ovina es va determinar el 1994 [67] (**Figura 7**) i més tard es van publicar les estructures tridimensionals de les formes recombinants de la COX-2 humana [68] i de ratolí [69]. La cadena polipeptídica de cada una de les subunitats que forma la COX està organitzada en tres dominis estructurals. La zona aminoterminal està constituïda per intradominis amb possibilitat de formar ponts disulfur. El segon domini està format per quatre hèlixs α de caràcter amfipàtic. Per acabar el domini més gran disposa d'una estructura globular a on es situa el domini catalític format per una estructura d'hèlixs α . Aquest domini forma dos lòbuls a la cara interna en els quals es localitza el grup hemo necessari per l'activitat peroxidasa (**Figura 7**). El dímer es forma per la interacció de la zona aminoterminal de manera que queda un canal amb una superfície hidrofòbica que dóna accés als dominis catalítics (**Figura 7**). No només els substrats lipídics tenen accés a aquest canal, sinó que també els antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) són capaços d'introduir-s'hi. Tot i que la COX-1 i la COX-2 tenen només un 60% d'homologia, els residus del centre actiu i del canal d'accés al centre actiu es troben molt conservats. De fet només existeixen dues variacions entre aas: la substitució de dues Isoleucines (Ile) per dues Valines (Val) en la isoforma COX-2, en les posicions 434 i 523 [67]. Tot i que les dues isoformes oxigenen l'AA amb cinètiques semblants (amb valors similars de Km i Vmàx) [70], en general la COX-2 és molt més eficient oxigenant substrats alternatius com l'àcid eicosapentanoic i l'àcid linolènic [65,71].

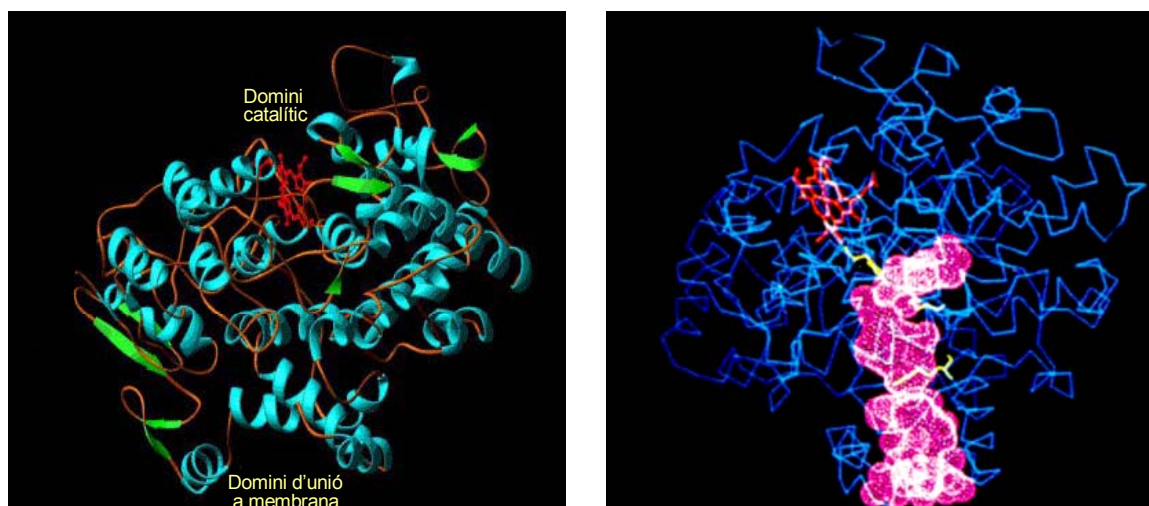


Figura 7. Estructura tridimensional d'una de les subunitats de la COX-1. En el panell de l'esquerra es remarca el domini catalític amb el seu centre actiu i el domini d'unió a membrana. Al panell de la dreta es mostra l'estructura de l'esquelet de carboni- α ressaltant en rosa el canal d'accés del substrat i el centre actiu (Figura adaptada de [67]).

La diferència més important entre les dues isoformes de la COX es relaciona amb la distribució tissular i la seva regulació. La COX-1 s'expressa de forma constitutiva en el reticle endoplasmàtic de la majoria de cèl·lules i es distribueix àmpliament a través del sistema gastrointestinal, ronyons, múscul llis vascular i plaquetes [72]. La COX-1 és responsable de la producció de PGs fisiològiques i homeostàtiques les quals exerceixen funcions citoprotectores de la mucosa gàstrica, afavoreixen la integritat de la funció plaquetària i són responsables del manteniment d'algunes funcions homeostàtiques en el ronyó [73-75]. Pel contrari, la COX-2 no es troba de forma habitual en cèl·lules diferenciades però pot ser induïda ràpidament en presència de citoquines o factors de creixement. Per tant, la isoforma COX-2 és la responsable de la síntesi de les PGs involucrades en la resposta inflamatòria [62,74,75].

Recentment s'ha descobert en cervell una tercera isoforma, la COX-3, la qual es formaria per una variant de l'*splicing* alternatiu de la COX-1 [76]. La COX-3 manté les propietats de la COX-1 i COX-2, però la presència d'un intró en el mRNA que l'ha de traduir fa que tingui una cadena extra de 30 aas més a l'extrem aminoterminal [76,77]. També s'ha trobat expressió de COX-3 en menor grau en aorta i teixit cardíac. La COX-3 és inhibida per analgèsics tipus paracetamol, diclofenac, ibuprofè i antipirètics com antipirina, aminopirina i fenacetina essent aquests últims inactius per la COX-1 i COX-2.

1.3.1.3 Activitat catalítica

La COX és l'enzim que transforma l'AA en PGH_2 , el precursor immediat de nombrosos prostanoids, incloent les PGs i TXs. La via de la COX presenta un interès clínic particular a causa de que és la principal diana terapèutica de molts fàrmacs com són els AINEs, els inhibidors selectius de la COX-2 i l'aspirina (ASA), tots ells utilitzats per millorar la inflamació, el dolor i la febre i prevenir l'aterotrombosi [71]. L'activitat catalítica dels dos isoenzims de la COX és prou semblant perquè es puguin tractar com si fossin enzims bioquímicament idèntics. Per tant, la bioquímica dels dos isoenzims es resumeix en una de sola.

La COX o PG sintasa H és un enzim bifuncional que catalitza les dues primeres reaccions de la biosíntesi de les PGs i TXs. La primera reacció consisteix en una oxigenació de l'AA que dóna lloc a la formació de l'endoperòxid cíclic PGG_2 , i la segona reacció es serveix de l'activitat peroxidasa de la COX i converteix la PGG_2 en PGH_2 [65] (**Figura 8**). Aquestes dues reaccions, d'oxigenació i de peroxidació, es donen de forma seqüencial.

El model del centre actiu de la COX es basa en (1) existeix un lloc d'unió del substrat (AA o AINEs) a la COX el qual és diferent del lloc d'unió dels hidroperòxids a la peroxidasa; (2) hi ha un sol grup hemo en la COX que està coordinat tant a la posició axial com distal per residus d'histidina; (3) un residu de tirosina (Tyr) serveix de conductor d'electrons entre els centres de

reacció de la peroxidasa i la COX; i (4) el lloc l'acetilació de l'ASA a la Ser530 és pròxim al centre actiu de la COX [78] (**Figura 9**).

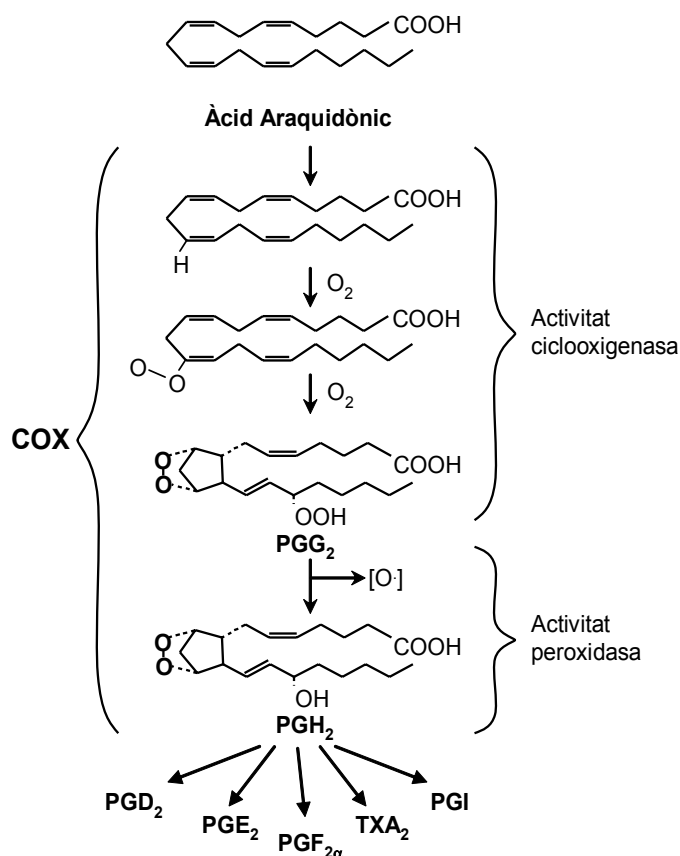


Figura 8. Acció seqüencial dels dos centres catalítics de la COX.

El radical Tirosina (Tyr) 385 inicia la reacció de la COX atraient l'hidrogen 13-*pro-S* de l'AA cap al centre catalític de la COX. El radical araquidonil resultant passa per una sèrie de transformacions que després de l'addició de la segona molècula d'oxigen produeixen un radical peroxil que actuarà com el precursor immediat de la PGG₂ regenerant-se el radical tirosil i així la COX podrà iniciar de nou un cicle catalític unint una nova molècula d'AA. El centre actiu peroxidasa consta del grup hemo i segueix un mecanisme molt similar al d'altres peroxidases com són el citocrom C o la mateixa peròxid dismutasa. La seva acció seria bàsicament la reducció del grup peròxid de la PGG₂ a alcohol, formant-se una nova PG, la PGH₂ (**Figura 8**). L'hidroperòxid, també anomenat activador hidroperòxid, s'uneix al centre peroxidasa i és reduït a alcohol donant-se una reducció concomitant del grup hemo, formant-se un compost de tipus I a on el ferro es troba en estat +4 i la porfirina és oxidada a radical catiònic. A la **Figura 9** es

mostra la disposició d'aquests centres ciclooxigenasa i peroxidasa en la molècula de l'enzim COX [78].

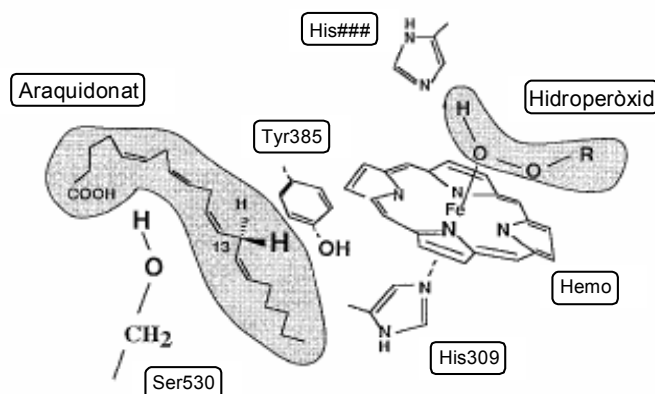


Figura 9. Disposició estructural del substrat (araquidonat) en els centres catalítics ciclooxigenasa i peroxidasa de l'enzim COX. (Figura adaptada de [78]).

La PGH_2 és un endoperòxid altament inestable que actua com a substrat intermediari de la síntesi d'un ampli ventall de prostanoids i TXs: PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , i TXA_2 (**Figura 4**). Aquests derivats lipídics mitjancen funcions i reaccions cel·lulars concretes que són específiques de cada cèl·lula i teixit.

1.3.1.3.1 Prostaglandines de la sèrie D, E i F

Quasi totes les cèl·lules del cos són capaces de produir una o varies PGs, essent la més freqüent la PGE_2 [79]. Les PGs de la sèrie D, E i F es formen a partir de la PGH_2 per diferents mecanismes (**Figura 4**). La PGE_2 , PGD_2 i la $PGF_{2\alpha}$ participen tant en els processos directament relacionats amb la inflamació com en altres processos fisiològics.

La PGD_2 es forma a partir de la PGH_2 gràcies a l'enzim citosòlic PGD sintasa mentre que la PGE_2 (**Figura 4**). La PGD_2 és la PG més abundant en el fetge, es considera el producte hepàtic més abundant de la COX [39]. La PGD_2 forma per deshidratació la ciclopentanona 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 (15d- PGJ_2) [80] (**Figura 4**). De fet s'ha vist que *in vivo* la font principal de 15d- PGJ_2 és la COX-2 [81].

La PGE_2 és formada per l'enzim d'unió a membrana PGE sintasa a partir de la PGH_2 . És ben coneguda com la PG iniciadora del dolor i de la producció d'edema en les zones inflamades

[58,82]. La PGE₂ també regula la producció d'àcid a l'estòmac, protegeix la mucosa gàstrica, i a nivell perifèric causa vasodilatació i broncodilatació.

Alternativament la PGH₂ pot ser convertida a PGF_{2α} gràcies a la PGF sintasa (**Figura 4**). La PGF_{2α} tindria efectes contraris a la PGE₂ ja que és una PG amb acció vasoconstrictora la qual provoca broncoconstricció i quan es troba més augmentada que la PGE₂ pot arribar a produir asma. A més la PGE₂ i la PGD₂ estimulen la desgranulació dels basòfils tissulars, els mastòcits, els quals amb el seu trencament alliberen histamina i cinines que són substàncies relacionades amb el dolor i l'augment local de la temperatura, fets que es donen com a mecanismes de defensa del propi organisme.

1.3.1.3.2 Prostaciclina

La prostaciclina (PGI₂) es troba de manera abundant en cèl·lules endotelials i en les cèl·lules musculars llises dels vasos sanguinis. Es forma també a partir de la PGH₂ gràcies a l'enzim PGI sintasa. La PGI₂ és un compost extremadament inestable amb una vida mitja de 30 segons que s'hidrolitza ràpidament a 6-keto-PGF_{1α} (**Figura 4**). Aquesta substància derivada de la PGI₂ és biològicament inactiva, però és força estable en solució aquosa. Per tant, la producció de PGI₂ es mesura normalment com l'increment de 6-keto-PGF_{1α}.

1.3.1.3.3 Tromboxà

El TXA₂ és un altre producte derivat de la PGH₂ que és sintetitzat per les plaquetes a través de l'enzim TX sintasa (**Figura 4**). El TXA₂ és una substància molt làbil, té una vida mitja de 3 minuts, i es transforma ràpidament a través d'una reacció no enzimàtica a TXB₂ (**Figura 4**). Trobem també TXA₂ a part dels trombòcits en leucòcits i macròfags [83].

El TX i la PGI₂ tenen efectes contraris, així mentre els TXs són agregants plaquetaris [84] i causen vasoconstricció, les prostaciclines tenen l'efecte oposat, és a dir són anti-agregants plaquetaris i causen vasodilatació. Depenent del tipus de situació en què es trobi l'organisme l'equilibri estarà més desplaçat cap a una activació de la TX sintasa o de la PGI₂ sintasa.

No obstant, l'acció fisiològica més important de les PGs és el paper que juguen en la inflamació [85]. Per tant, com a resposta a un atac inflamatori, l'alliberament de PGs, principalment de PGE₂, constitueix una peça clau en el desenvolupament de les tres senyals principals d'inflamació: vasodilatació (eritema), increment de la permeabilitat vascular (edema) i aparició de dolor (hiperalgèsia) [85].

Estudis recents han indicat que la COX-2 acetilada per l'ASA converteix l'AA en àcid 15*R*-HETE el qual és transformat a 15-epi-LXs [86] (Veure apartat 1.3.1.5.1.2, **Figura 4**). A més quan les cèl·lules que expressen COX-2 s'exposen a ASA aquestes transformen l'àcid omega-3 docosahexaenoic (DHA) a 17*R* hidroxi-DHAs [87] (**Figura 4**). Tant les 15-epi-lipoxines (15-epi-LXs) com els hidroxi-DHAs disposen de propietats antiinflamatòries potents i juguen un paper clau en la resolució de la inflamació.

1.3.1.4 Receptors dels prostanoids

Els prostanoids activen una sèrie de receptors que són específics de cèl·lula i teixit. Existeixen nou grups de receptors i diverses variants d'*splicing* que pertanyen a una subfamília de receptors lligats a proteïna G (GPCR).

Quatre dels receptors uneixen PGE₂ (EP1-EP4), dos uneixen PGD₂ (DP1 i DP2) i la resta són receptors únics per PGF_{2α}, PGI₂ i TXA₂ (FP, IP i TP respectivament) [88]. Els receptors IP, DPI, EP2 i EP4 estan units a l'activació de proteïna G i lligats a l'increment de AMPc intracel·lular mentre que EP1, FP i TP estan units a proteïna G_q que provoca un increment de la concentració de Ca²⁺ intracel·lular. Sorprenentment el receptor EP3 està unit a proteïna G_i i disminueix la formació de AMPc.

Les PGs generades per la COX-2 es localitzen a la membrana nuclear i a més d'unir-se a receptors lligats a proteïna G poden controlar les vies nuclears a través d'interaccions amb els PPARs. Aquí radica la importància de la COX-2 com a reguladora d'esdeveniments nuclears en el creixement cel·lular i en la supervivència [89]. Recentment s'ha vist que la PGJ₂ i altres metabolits relacionats poden activar el PPAR_γ produint canvis en la proliferació cel·lular promovent la diferenciació d'adipòcits [90].

1.3.1.5 Inhibidors de la ciclooxigenasa

Els AINEs són un conjunt de medicaments antiinflamatoris, analgèsics i antipirètics heterogenis que presenten accions terapèutiques amb certs efectes secundaris. El prototipus d'aquest grup de compostos és l'ASA [91]. Gràcies a les seves propietats beneficioses els AINEs han estat fàrmacs de gran interès des de finals del segle XIX coincidint amb la comercialització de l'ASA.

La majoria d'AINEs són àcids orgànics febles a excepció del nabumetone que és una cetona que es metabolitza cap al seu compost actiu acídic. La majoria d'aquests medicaments s'absorbeixen bé i el menjar no canvia substancialment la seva biodisponibilitat. Les característiques farmacocinètiques dels principals AINEs es resumeixen a la **Taula 2** [92].

Medicament	Vida mitja (hores)	Excreció urinària	Dosi d'AINE recomanada
Aspirina	0.25	<2%	1200-1500 mg tid
Salicilat ¹	2-19	2-30%	Veure peu 2
Apazone	15	62%	600 mg bid
Celecoxib	11	27%	100-200 mg bid
Diclofenac	1.1	<1%	50-75 mg qid
Diflunisal	13	3-9%	500 mg bid
Etedolac	6.5	<1%	200-300 mg qid
Fenoprofè	2.5	30%	600 mg qid
Flurbiprofè	3.8	<1%	300 mg tid
Ibuprofè	2	<1%	600 mg qid
Indometacina	4-5	16%	50-70 mg tid
Ketoprofè	1.8	<1%	70 mg tid
Keterolac	4-10	58%	10 mg qid ⁴
Meclofenamat	3	2-4%	100 mg qid
Meloxicam	20	Dada no trobada	7.5-15 mg qd
Nabumetone ⁵	26	1%	1000-2000 mg qd ⁶
Naproxè	14	<1%	375 mg bid
Oxaprozin	58	1-4%	1200-1800 mg qd ⁶
Piroxicam	57	4-10%	20 mg qd ⁶
Rofecoxib	17	72% ³	12.5-50 mg qd
Sulindac	8	7%	200 mg bid
Tolmetin	1	7%	400 mg qid
Valdecoxib	8-11	90% ³	10 mg qd

¹El metabòlit principal de l'aspirina

²El salicilat es dona normalment en forma d'aspirina

³Excreció urinària total incloent metabòlits

⁴Recomenat únicament pel tractament agut

⁵Nabumetone és una pre-droga; la vida mitja i l'excreció urinària són del seu metabòlit actiu

⁶Una única dosi al dia és suficient degut a la seva vida mitja llarga

Taula 2. Característiques farmacocinètiques dels AINEs (Taula adaptada de [92]).

Molts dels AINEs són altament metabolitzats, alguns per mecanismes de fase I seguits de fase II i d'altres per glucuronització directa (fase II). El metabolisme hepàtic de la majoria dels AINEs té lloc, en part, a través de la via de les famílies CYP3A o CYP2C de l'enzim P450.

Tots els AINEs presenten com a principal diana farmacològica la COX. El 1971 *Vane* [82], *Ferreira et al.* [93] i *Smith i Willis* [94] van observar per primera vegada que els AINEs reduïen o prevenien la producció de PGs per inhibició directe de la COX. Avui dia els AINEs són un dels

medicaments de més àmplia utilitat en tot el món i tenen una gran utilitat clínica en el tractament del dolor, la febre i la inflamació. També cal remarcar que són el grup farmacològic que causa menys reaccions adverses.

Els AINEs bloquegen l'acció catalítica de la COX formant ponts d'hidrogen amb els aas del canal enzimàtic. Alguns AINEs, com és el cas de l'ASA, l'indometacina, l'ibuprofè, etc., actuen com a inhibidors no selectius de la COX inhibint les seves dues isoformes. Per tant, l'administració d'aquests compostos a concentracions necessàries per inhibir la biosíntesi de PGs inflamatòries (PGs que provenen de la COX-2) també inhibeix la producció de PGs constitutives del sistema gastrointestinal i renal (PGs que provenen de COX-1) fent perillar d'aquesta manera la integritat de la mucosa gàstrica i renal, i la funció plaquetària.

Així doncs, els efectes antiinflamatoris dels AINEs es poden explicar per la inhibició de la COX-2, mentre que els efectes secundaris indesitjats, com les lesions de la mucosa gàstrica o renal, es poden explicar per la inhibició de la COX-1.

De totes maneres, donat que aquests inhibidors no selectius presenten un número important d'efectes secundaris adversos, molts altres AINEs s'han desenvolupat per tal d'incrementar la seva eficàcia i disminuir la seva toxicitat [92]. Entre aquests nous AINEs cal destacar els inhibidors selectius de la isoforma induïble de la COX, els inhibidors selectius de COX-2 (**Figura 20**).

En resum destacarem l'existència de tres classes àmplies d'inhibidors de la COX:

- a) L'ASA, sintetitzada a partir de l'àcid salicílic.
- b) L'indometacina i altres AINEs millorats gràcies als estudis realitzats en models d'inflamació i dany de la mucosa gàstrica.
- c) Els inhibidors selectius de la COX-2, els coxibs (celecoxib i rofecoxib), que s'engloben a dins dels inhibidors de COX-2 de primera generació. Altres inhibidors selectius de la COX-2 desenvolupats més recentment, com és el cas del valdecoxib i l'etoricoxib, pertanyen al grup dels coxibs de segona generació [95,96].

1.3.1.5.1 L'aspirina

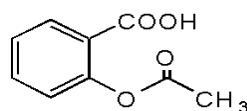
L'eficàcia terapèutica de l'ASA i dels compostos derivats és coneguda des de fa més de 2000 anys. De fet, abans de l'era cristiana els metges ja preparaven extractes de l'escorça del salze blanc (*Salix alba vulgaris*), de la gaulteria (*Gaultheria procumbens*) o de la reina dels prats

(*Spiraea ulmaria*) per utilitzar-los pel tractament d'una gran varietat de desordres des de la sepsis i l'artritis fins al mal de queixal i els dolors menstruals [4]. No obstant, no va ser fins els segles XIX quan, gràcies als progressos de la química, es va aconseguir aïllar d'aquestes plantes les substàncies químiques de la família dels salicilats i transformar-les en àcid salicílic (del llatí *salix*, salze).

El 1828 Buchner va aïllar de l'escorça del salze una substància que la va anomenar salicilina. El 1829 Leroux va purificar per primera vegada el compost actiu de la salicilina. Uns anys més tard Piria va descobrir la naturalesa glucosídica de la salicilina la qual després de diverses oxidacions produeix glucosa i alcohol salicílic. També es va demostrar que aquest últim compost presentava propietats antipirètiques [97,98] i podia ser convertit a àcid salicílic, ja fos *in vivo* o per manipulació química [91].

Pagesstecher el 1835 va aconseguir aïllar de les flors de *Spiraea* un àcid que el va anomenar àcid espíric i que posteriorment es va identificar també com a àcid salicílic [99]. El 1874 Kolbe va sintetitzar industrialment l'àcid salicílic i es va utilitzar com a substància terapèutica. El salicilat sòdic s'utilitzà per primera vegada el 1875 pel tractament de la febre reumàtica i també com a antipirètic.

Ja en el 1853 Gerhardt havia sintetitzat per primera vegada l'àcid acetilsalicílic però no va pensar que pogués arribar a actuar com un compost terapèutic. No va ser fins el 1897 quan el farmacòleg alemany Fèlix Hoffmann va aconseguir sintetitzar de nou en forma pura i estable el component actiu de l'ASA, l'àcid acetilsalicílic, el qual presentava propietats terapèutiques (**Figura 10**). L'ASA té una estructura química composta per un anell benzè, un àcid i un grup metil èster (**Figura 10**). La seva estructura química és important a l'hora d'exercir la seva activitat inhibidora de la COX.



l'àcid acetilsalicílic

Figura 10. Fèlix Hoffman el 1897 va descobrir el principi actiu de l'aspirina, l'àcid acetilsalicílic.

La seva eficàcia terapèutica com analgèsic i antiinflamatori va ser descrita el 1899 pel farmacòleg alemany Heinrich Dreser i es va introduir aquest compost en la medicina amb el nom d'aspirina. L'Aspirina és doncs el nom comercial de l'àcid acetilsalicílic, donat per

l'empresa farmacèutica Bayer (**Figura 11**). L'ASA conté un únic principi actiu: l'àcid acetilsalicílic. Aquest nom va ser creat associant el prefix *a-* per acetil, *-spir-* recordant el nom de la planta de la qual se'n deriva (*Spiraea ulmaria*) i el sufix *-in* habitualment utilitzat pels noms de substàncies químiques (cafeïna, quinina, morfina, etc.) [91]. L'any 1971 el doctor John Vane va demostrar per primera vegada que l'ASA i l'indometacina inhibien la producció de PGs al bloquejar l'activitat enzimàtica de la COX [82].

Tot i la introducció en el mercat farmacèutic de nous compostos, actualment l'ASA és encara l'agent analgèsic, antipirètic i antiinflamatori més receptat.



Figura 11. L'empresa farmacèutica Bayer fent propaganda del seu nou producte, l'aspirina.

1.3.1.5.1.1 Mecanisme d'acció

La COX-1 disposa d'un domini catalític que consisteix en una estructura globular que conté els centres actius de les activitats ciclooxygenasa i peroxidasa (**Figura 7 i 9**). El centre actiu de l'activitat peroxidasa conté un grup hemo. Aquest centre actiu es troba al final d'un túnel llarg i estret o canal hidrofòbic (**Figura 7 i 12**). Tres dels segments d'hèlix α del domini d'unió a la membrana es troben a l'entrada d'aquest túnel (**Figura 7**). En condicions normals l'AA alliberat de la membrana plasmàtica es difon a través del canal hidrofòbic fins arribar al centre catalític de l'enzim on és transformat a PGG₂ i posteriorment a PGH₂ (**Figura 12**). D'entre tots els AINEs d'ús mèdic, només l'ASA té la propietat d'acetilar de forma covalent i irreversible el residu de Ser530 del centre catalític de la COX amb la consegüent alliberació de salicilat (**Figures 12 i 13**), de forma que el canal queda inaccessible pel substrat, l'AA. Un cop la COX ha incorporat aquest grup acetil es torna inactiva.

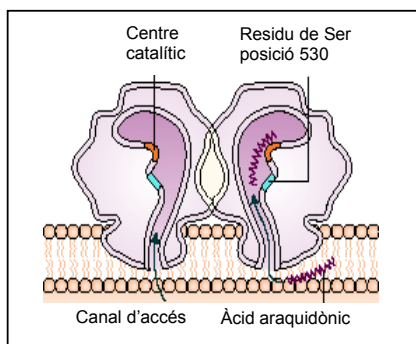


Figura 12. La COX anclada en forma de dímer a la membrana plasmàtica. L'AA arriba al centre catalític de la COX a través del canal hidrofòbic. L'ASA acetila irreversiblement la Ser530 que està a prop del centre catalític implicant l'accés del substrat a aquest centre (Figura adaptada de [96]).

Per tant, l'ASA és l'únic modificador covalent de COX-1 i COX-2 i produeix una inhibició irreversible de l'enzim, per acetilació de l'enzim.

Els estudis cristal·logràfics de *Garavito et al.* [67,100] van demostrar el per què aquesta droga és tant eficient a l'hora d'acetilar la Ser530 de la COX-1. Com altres AINEs, l'ASA es difon cap al centre actiu de la COX a través de la boca del canal i atravesa el canal fins al punt de constricció format per la Arg120, la Tyr355 i la Glut524. En aquest punt del canal, el grup carboxílic de l'ASA forma un enllaç iònic feble amb la cadena lateral de la Arg120, posicionant a l'ASA només a 5 Å per sota la Ser530 i a l'orientació correcta per la transacetilació [100]. Degut a què la butxaca catalítica del canal és una mica més gran en la COX-2 que en la COX-1, l'orientació de l'ASA per atacar a la Ser530 no és tant bona, i l'eficiència de transacetilació en la COX-2 és reduïda. Això explica que la COX-2 presenti més baixa sensibilitat a l'ASA que la COX-1 (de 10 a 100 vegades menys).

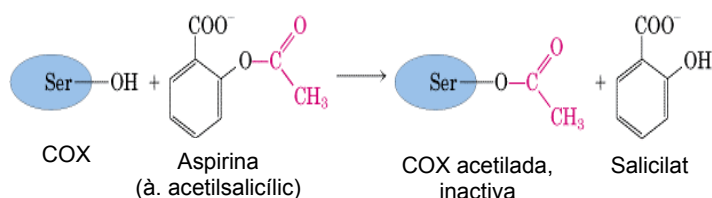


Figura 13. Acetilació de la COX per part de l'aspirina.

1.3.1.5.1.2 Formació de lipoxines i 15-epi-lipoxines

Tot i que la majoria de les propietats farmacològiques de l'ASA estan relacionades amb la seva habilitat d'acetilar la COX desencadenant una inhibició irreversible de la síntesi de PGs [82,93,94], el mecanisme d'acció complet de l'ASA és encara objecte d'estudi.

Gairebé un segle i mig després, sembla que els científics han aconseguit millorar el disseny inicial d'ASA de Hoffman. Els primers eicosanoids antiinflamatoris generats pel nostre propi organisme i que estan involucrats en la resolució de la inflamació són les lipoxines (LXs) [101]. Aquestes molècules són substàncies lipídiques naturals alliberades pel cos durant el procés normal d'inflamació. *Serhan et al.* van descobrir que les cèl·lules blanques de la sang i les plaquetes produïen LXA₄ [101].

Les LXs són estructuralment semblants a les PGs i als TXs i, de fet, deriven del mateix precursor, l'AA, però la seva formació es dona a través de diferents intermediaris enzimàtics i mitjançant el procés conegut com a biosíntesi transcel·lular [101] (**Figura 14**).

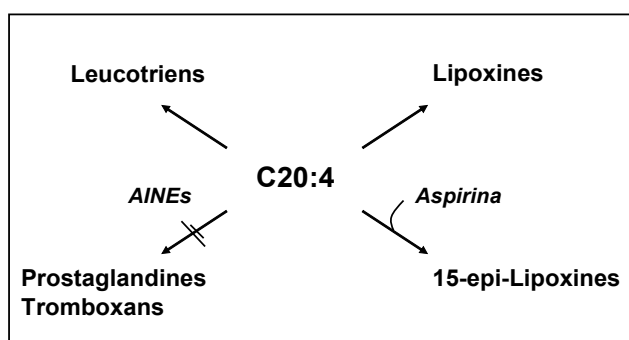


Figura 14. Formació de nous compostos derivats de l'AA: lipoxines i 15-epi-lipoxines

El metabolisme transcel·lular és un fet comú en la formació d'eicosanoids i implica la generació d'un intermediari metabòlic per part d'una cèl·lula donadora i el processament d'aquest intermediari per una cèl·lula acceptora veïna que produirà un eicosanoid actiu el qual no podria ser sintetitzat per una sola cèl·lula.

La biosíntesi d'eicosanoids per interaccions transcel·lulars està reconeguda com un procés important en l'amplificació i generació dels nous mediadors lipídics, particularment d'aquells produïts per les LOs [102]. En humans, la biosíntesi de LXs és un exemple de les interaccions a través de vies transcel·lulars [102,103]. Les LXs es poden generar per una de les tres rutes que poden ser operatives tant de forma independent com en conjunt [101,102].

En els mamífers, la via principal de biosíntesi transcel·lular involucra la interacció seqüencial de la 15-LO i la 5-LO (**Figura 15**). La primera via biosintètica de formació de LXs descrita implica

la inserció d'un oxigen molecular en el carboni 15 de l'AA, predominantment en la configuració S. Aquest fet implica a l'enzim 15-LO en la generació de molècules bioactives [104].

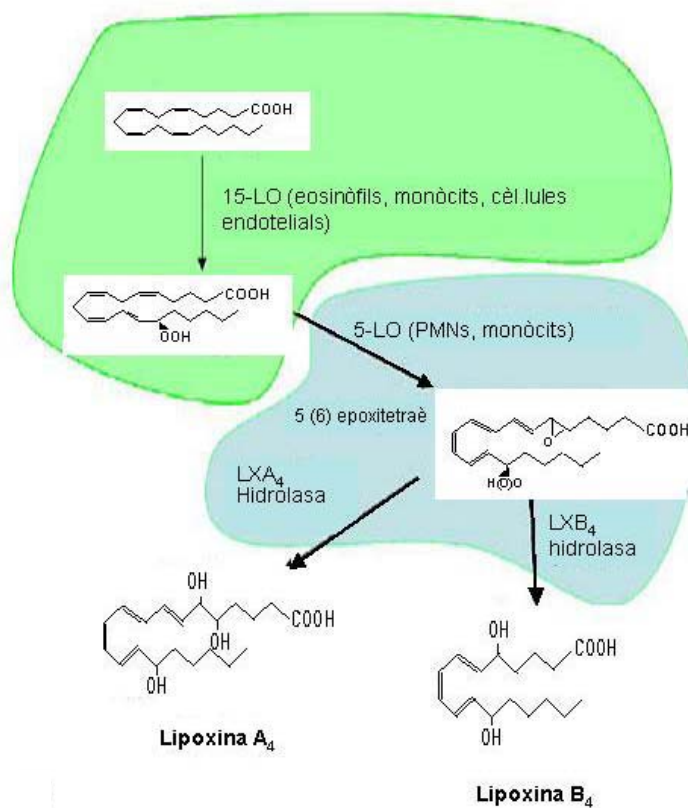


Figura 15. Biosíntesi de lipoxines, via 1.

La formació de LXs a través de la 15-LO es dona en eosinòfils, macròfags alveolars, monòcits i cèl·lules epitelials en les quals la 15-LO està sobreexpressada per citocines antiinflamàtores com la IL-4 i la IL-13 [105]. Una vegada aquestes cèl·lules estan activades poden generar i alliberar àcid 15S-HETE, el qual serveix de substrat a la 5-LO dels neutròfils i monòcits que sintetitzaran les LXs. La 5-LO es troba també sota control de citocines (GM-CSF i IL-3). S'ha demostrat que tant la LXA₄ com la B₄ són vasoactives i vasodilatadores en la majoria d'òrgans i en models *in vivo* [106,107]. La LXA₄ actua com un agent antiinflamatori natural que dirigeix els leucòcits a parar la migració.

Una via semblant de biosíntesi transcel·lular de LXs s'ha descrit en el fetge. En el sinusoides hepàtic el 15S-HETE alliberat pels hepatòcits que expressen 15-LO és convertit a LXs per les KCs, les quals són l'únic tipus cel·lular sinusoidal que presenta activitat 5-LO [108]. De fet l'anàlisi per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) dels materials obtinguts de les

incubacions d'hepatòcits i cèl·lules sinusoidals revela la presència d'una gran absorvència a 300 nm que correspon a la regió d'absorció de les LXs; a més el perfil d'elució és consistent amb el de la LXA₄ sintètica [108].

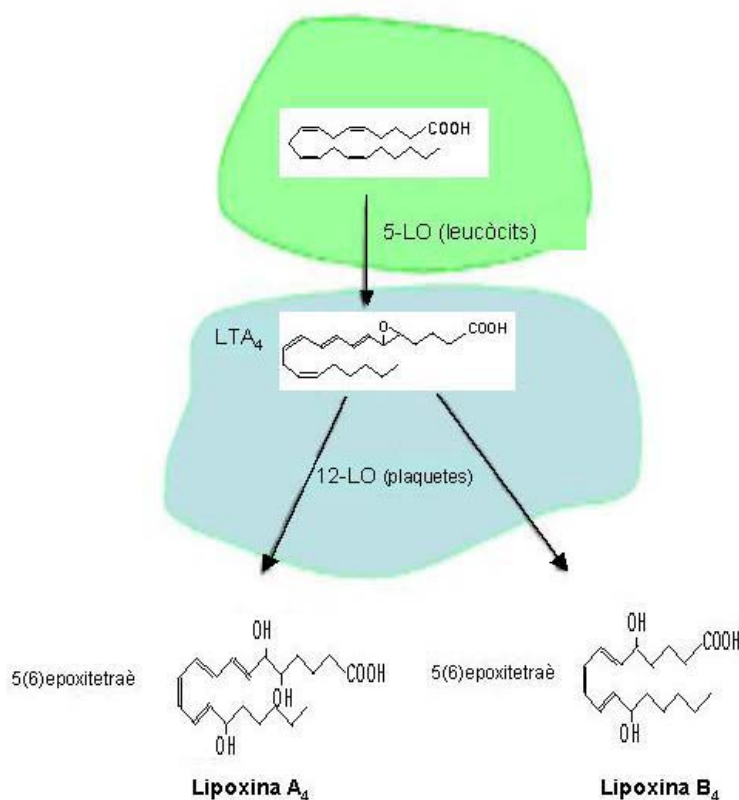


Figura 16. Biosíntesi de lipoxines, via 2.

Una segona via reconeguda de biosíntesi de LXs té lloc entre els diferents tipus cel·lulars de la vasculatura, per exemple la interacció que es dona entre els neutròfils humans i les plaquetes. Les oxigenases que estan implicades en aquest esquema biosintètic són la 5-LO dels neutròfils humans i la 12-LO, la qual és present en grans quantitats en les plaquetes humanes [109,110] (**Figura 16**).

Uns anys més tard es va identificar una nova via de biosíntesi de LXs que té lloc en presència d'ASA. Es formen les anomenades 15-epi-LXs les quals presenten propietats antiinflamatòries semblants a les LXs natives [85] (**Figura 17**).

Com hem vist en el mecanisme d'acció de l'ASA (apartat 1.3.1.5.1.1), aquest AINE acetila la Ser530 de la COX-2 [111] (**Figura 12**) que es troba a l'entrada del túnel del centre catalític i aquest grup acetil cedit per l'ASA actua ocupant i bloquejant el túnel, impedit l'entrada de l'AA al centre actiu.

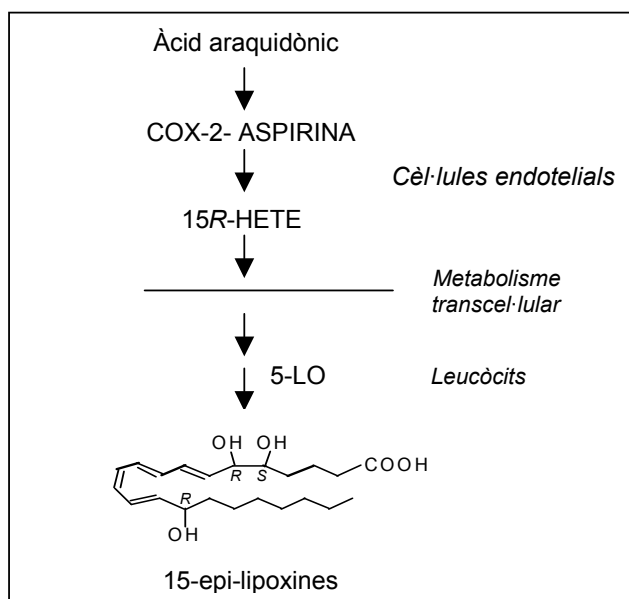


Figura 17. Biosíntesi de lipoxines, via 3. Síntesi de epi-LXs derivades de l'ASA. Esquema del mecanisme d'acció de l'ASA en cèl·lules epitelials. L'acetilació de la COX-2 genera 15R-HETE que per conversió transcel·lular en els leucòcits activats forma les 15-epi-LXs.

Per tant, s'inhibeix la síntesi de PGs, ara bé, no és una inhibició total de l'enzim sinó que la COX-2 acetilada resultant permet que l'AA entri en part en el túnel catalític i pugui formar 15R-HETEs els quals, per mecanismes transcel·lulars, són capaços d'acabar formant compostos endògens antiinflamatoris, les 15-epi-LXs (**Figura 17**).

Així doncs, en un escenari inflamatori i durant la interacció de l'endoteli vascular o de les cèl·lules epitelials amb els neutròfils, el 15R-HETE és transformat per la 5-LO dels neutròfils activats a una nova classe de compostos antiinflamatoris endògens, les 15-epi-LXs, que porten l'alcohol del carboni-15 en configuració *R*, a diferència de les LXs natives que el presenten en configuració *S* [86,101]. L'intermediari 15R-HETE pot formar tant 15-epi-LXA₄ com 15-epi-LXB₄. La 15-epi-LXA₄ sembla ser més potent que la LXA₄ a l'hora d'inhibir l'adhesió dels neutròfils, i la 15-epi-LXB₄ sembla ser un inhibidor de la proliferació cel·lular [112]. Per tant, aquestes 15-epi-LXs actuen com a senyals de reclutament de leucòcits i juguen un paper important en la resolució de la inflamació i consegüentment mitjancen, en part, una de les accions beneficioses de l'ASA [86,101] (**Figura 17**). A més s'ha suggerit que aquests nous eicosanoids quan es generen en un microentorn tissular poden contribuir a l'acció terapèutica de l'ASA disminuint el risc d'infart de miocardi i de càncer [113,114].

Altrament es va observar que al aplicar els anàlegs estables de LXA₄ i de 15-epi-LXA₄ per via tòpica a l'orella de ratolins, es reduïa marcadament la infiltració de neutròfils *in vivo* i es produïa

una disminució de la inflamació aguda en un 95 per cent. Així, aquests nous compostos sobrepassaven la potència antiinflamatòria de l'ASA i per tant resultaven ser molt més potents i, fins i tot, més eficaços que la dexametasona [115]. En un treball previ realitzat pel nostre grup en hepatòcits de rata es va estudiar l'impacte de l'ASA sobre el metabolisme de l'AA i es va demostrar que aquest AINE a part d'inhibir la via de la COX, afavoria la formació de 15R-HETE [108]. A més, es va veure en leucòcits que aquests 15R-HETEs per biosíntesi trancel·lular podien originar potents antiinflamatoris endògens, les 15-epi-LXs (15-epi-LXA₄), ja que aquest tipus cel·lular disposa de l'enzim necessari per la seva síntesi, la 5-LO [108]. Per consegüent aquestes molècules, les 15-epi-LXs, van suposar un nou descobriment i un nou punt de mira per tal de reduir els processos inflamatoris.

1.3.1.5.2 Altres antiinflamatoris no esteroïdals no selectius

S'ha vist que altres AINEs a part de l'ASA també inhibeixen tant la COX-1 com la COX-2 per competició amb el substrat, per tal d'unir-se al centre actiu de la COX. No obstant, els AINEs difereixen significativament els uns dels altres depenent de si s'uneixen al centre catalític de la COX d'una manera temps depenent o independent [116]. En concret, els AINEs es diferencien entre ells depenent de com de ràpid poden unir-se al centre actiu de la COX i com de ràpid poden sortir del canal que porta a aquest centre actiu [117]. Alguns AINEs presenten temps d'unió i desunió molt ràpids, com és el cas de l'ibuprofè [118]. Aquests fàrmacs no mostren ser temps depenents. Inhibeixen l'activitat essencial de la COX instantàniament després de l'addició de l'AINE, i ells immediatament s'esfumen del lloc actiu de la COX quan l'AINE és retirat de l'entorn de l'enzim.

En contrast, altres AINEs com la indometacina i el diclofenac són temps depenents. Els components d'aquest grup necessiten de segons a minuts per unir-se al lloc actiu de la COX. No obstant, un cop units, aquests fàrmacs presenten típicament nivells baixos de desunió que requereixen d'hores perquè l'AINE s'alliberi del centre actiu. Els AINEs temps-depenent competeixen de forma molt pobre amb l'AA en assaigs instantanis d'activitat de la COX. Els AINEs temps-depenent s'uneixen al lloc actiu de la COX primer amb una interacció feble i llavors produeixen un complex fort. El pas limitant en la unió del fàrmac és la formació de la conformació d'unió forta de l'AINE a dins del canal de la COX. Durant aquest segon pas de la unió de l'AINE presenta una gran importància el punt de constricció creat pels ponts d'hidrogen de la xarxa de Arg120, Tyr385 i Glu524 i la dificultat que presenten alguns AINEs per travessar-lo. Un possible escenari és que els AINEs temps-dependent requereixin d'heterogeneïtat conformacional en el lloc de la constricció causada per la respiració molecular del polipèptid per tal d'entrar a dins de la part alta del canal catalític.

El SC-560 (**Figura 18**) és un membre dels inhibidors de la COX de la classe dels diaril heterociclats la qual inclou també el celecoxib (celebrex) i el rofecoxib (Vioxx). No obstant, a diferència d'aquests inhibidors selectius comercials de COX-2, el SC-560 és un inhibidor selectiu de COX-1. Utilitzant enzims recombinants humans s'ha vist que la IC_{50} del SC-560 és de 9 nM per COX-1, mentre que la corresponent IC_{50} per COX-2 és 6.3 μ M [119]. Per tant, el SC-560 mostra 700 vegades més selectivitat per l'enzim COX-1 que per COX-2. S'ha vist que el SC-560 és oralment actiu en rata, on una dosi de 10 mg/Kg suprimeix completament la producció de TXB_2 en sang total induïda pel ionòfor. No obstant, el SC-560 és inefectiu en el tractament de la inflamació en un model de *air-pouch* d'inducció per LPS, en el qual la formació de PGs derivades de la isoforma COX-2 juga un paper significatiu en el procés inflamatori [120].

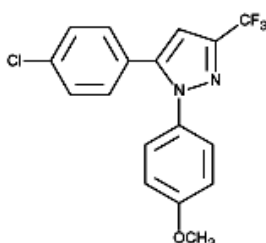


Figura 18. Estructura molecular del SC-560.

1.3.1.5.3 Inhibidors selectius de COX-2

1.3.1.5.3.1 COX-2 i inflamació

La via de la COX presenta un especial interès clínic perquè molts AINEs actuen a nivell d'aquesta via, alleugerint la inflamació, el dolor i la febre. En concret la COX-2 és l'enzim clau en el desenvolupament de la inflamació incontrolada [66,121].

Com s'ha vist la COX-2 és un gen induïble que pot ser sobreexpressat per diferents estímuls proinflamatoris, incloent citoquines, mitògens i factors de creixement. La sobreexpressió de COX-2 s'ha descrit en diverses malalties cròniques inflamatòries com és el cas de l'artritis reumatoïdes, la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa [66,121].

En el moment actual sabent que la COX-2 està clarament associada amb la inflamació i no amb la síntesi fisiològica de PGs, els inhibidors selectius de COX-2 ofereixen la possibilitat d'inhibir a les PGs inflamatòries sense afectar a les PGs generades per COX-1 a l'estómac, al ronyó o a les plaquetes.

1.3.1.5.3.2 Coxibs

Els inhibidors selectius de la COX-2 o coxibs es van desenvolupar amb la finalitat d'inhibir la síntesi de PGs procedents de l'isoenzim COX-2 induït a llocs amb inflamació, sense afectar a l'acció de l'isoenzim constitutiu actiu COX-1, expressat en el tracte intestinal, ronyons i plaquetes.

Els coxibs s'uneixen i bloquegen selectivament el lloc actiu de la COX-2 de forma més efectiva que el de la COX-1. Els inhibidors de COX-2 tenen un efecte analgèsic, antipirètic i antiinflamatori semblant al dels AINEs no selectius però amb menys efectes secundaris gastrointestinals. També s'ha demostrat que els inhibidors de COX-2 no tenen efecte sobre l'agregació plaquetària, la qual és produïda per COX-1. Per tant, els coxibs no exerceixen la funció cardiprotectora que ofereixen els AINEs tradicionals no selectius [92,95].

Existeix una diferència estructural important entre els centres actius de COX-1 i COX-2 que consisteix en una substitució de la Ile523 de la COX-1 per una Val en la COX-2 (**Figura 19**).

La Ile523 de la COX-1 produeix dues protuberàncies prominents en el centre actiu de l'enzim. Aquestes protuberàncies impedeixen l'accés dels substituents aromàtics d'alguns fàrmacs selectius de COX-2 a dins la cavitat (també anomenada "butxaca") d'aquest centre actiu (**Figura 19**).

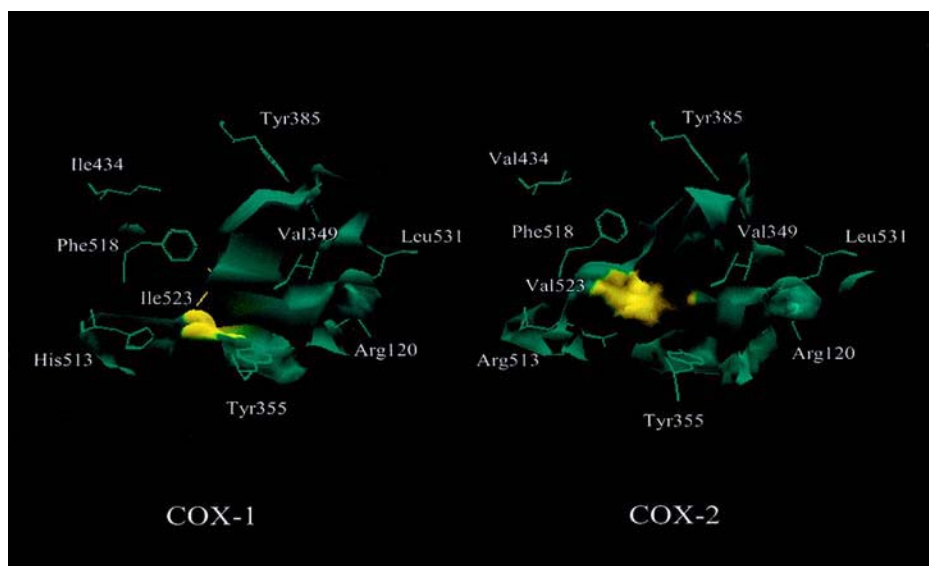


Figura 19. Contorn dels centres actius de la COX-1 i la COX-2. Destacant en groc a l'esquerra les protuberàncies causades per la Ile523 del centre actiu de COX-1. Destacant en groc a la dreta la Val523 de COX-2 la qual no crea protuberàncies i permet l'accés dels coxibs a dins la butxaca.

Pel contrari, el residu de Val de la COX-2 no crea aquestes protuberàncies i permet l'accés dels coxibs a dins de la butxaca catalítica (**Figures 19 i 21**). Aquesta única diferència obra una cavitat hidrofòbica major en la COX-2 que en la COX-1 donant més accessibilitat als diferents fàrmacs que actuen com a inhibidors selectius de COX-2 [69,122].

Existeixen diferents inhibidors selectius de COX-2, l'estructura dels més representatius es mostra en la **Figura 20**. El 1999 el celecoxib (Celebrex) i el rofecoxib (Vioxx) van ser comercialitzats com els primers AINEs desenvolupats com a inhibidors selectius de COX-2. Altres AINEs incloent el meloxicam (Mobic), el nimesulid i l'etodolac (Lodine), els quals van ser comercialitzats més aviat a Europa i a Estats Units com a AINEs més segurs, van ser classificats, després del descobriment de la COX-2, com els inhibidors preferents d'aquest enzim. Aquest primer grup de coxibs s'englobarien a dins dels inhibidors selectius de COX-2 de primera generació.

Actualment, la segona generació de coxibs, com el valdecoxib [123] i l'etoricoxib [124] són utilitzats en el mercat com a agents selectius de COX-2. El medicament més selectiu d'aquesta segona generació de coxibs és el lumiracoxib [125] el qual difereix de la resta en què és un anàleg del diclofenac.

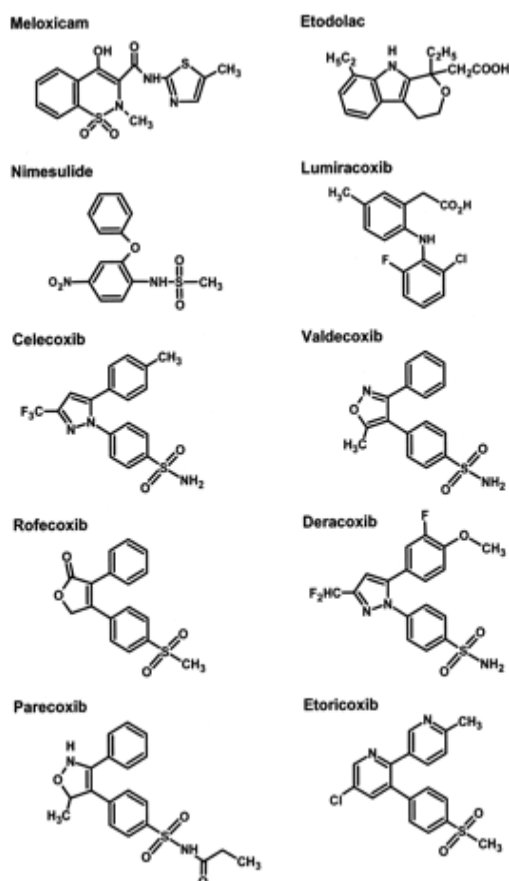


Figura 20. Comparació estructural dels principals inhibidors selectius de COX-2 comercials.

El celecoxib i el rofecoxib són compostos diaril que contenen una sulfonamida i una metilsulfona, respectivament, en comptes d'un grup carboxil (**Figura 20**). Cada un d'aquests compostos és un inhibidor temps-indepenent dèbil de COX-1, però és un inhibidor temps-depenent de COX-2. El celecoxib és un inhibidor de COX-2 altament selectiu, de deu a vint vegades més selectiu per COX-2 que per COX-1 [92] (**Figura 21**). Les seves característiques farmacològiques i la dosi es presenten a la **Taula 2**. El celecoxib és igualment efectiu, com els altres AINEs, en el tractament de l'artritis reumatoides i en l'osteoartritis. S'ha vist que la seva utilització en diferents assaigs clínics ha causat menys úlceres endoscòpiques que molts d'altres AINEs. De totes maneres al presentar en la seva estructura una sulfonamida pot arribar a causar erupcions tot i que no afecta a l'agregació plaquetària. El celecoxib no causa més edema o efectes renals que els altres AINEs, però s'han documentat casos d'edema i d'hipertensió [92].

El rofecoxib va ser utilitzat també en el tractament de l'osteoartritis, en condicions de dany agut i en la dismenorrea. Va ser comercialitzat per Merck a sota els noms de Vioxx, Ceoxx i Ceeox. Recentment es va procedir a la retirada voluntària del mercat perquè incrementava el risc d'atacs de cor i d'infart de miocardi [92].

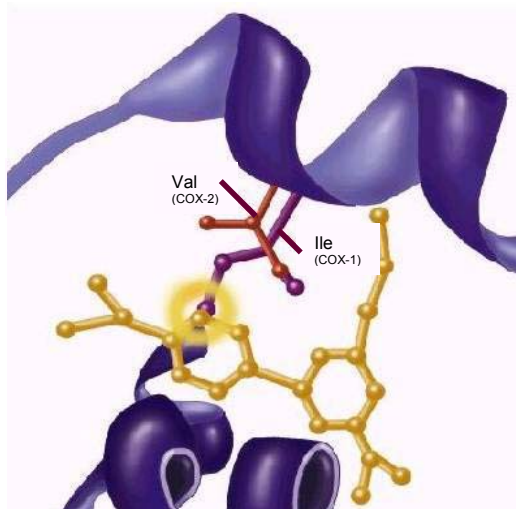


Figura 21. Unió del celecoxib al centre actiu de la COX. Cal observar l'impediment que exerceix el residu de Isoleucina de COX-1 a diferència del de Valina de COX-2.

El SC-236 (**Figura 22**) és un inhibidor altament selectiu de COX-2 i molt potent ($IC_{50} = 10$ nM per COX-2 envers $IC_{50} = 17.8$ mM per COX-1) [126] amb propietats antitumorals. Tot i que no és utilitzat clínicament, és disponible comercialment i permet realitzar estudis farmacològics. Presenta una vida mitja més llarga [127] i en un model de rates en dejú es va veure que

produïa toxicitat gàstrica reduïda. El SC-236 presenta propietats antiproliferatives i antitumorals [128,129] i ha estat demostrat que indueix apoptosi i un increment de la sensibilitat a la radiació en les cèl·lules supervivents. Aquest inhibidor selectiu de COX-2 ha estat classificat com un inhibidor d'angiogènesi degut a que produeix una reducció del factor bàsic de creixement de fibroblasts (FGF) i del factor de creixement endotelial vascular (VEGF) [130].

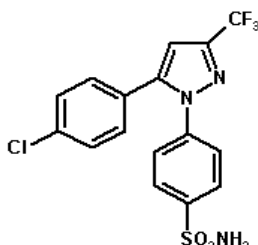


Figura 22. Estructura del SC-236

1.4 EICOSANOIDS I INFLAMACIÓ HEPÀTICA

1.4.1 ESTRUCTURA DEL SINUSOIDE HEPÀTIC

El sinusoides hepàtic constitueix la unitat funcional del fetge i es caracteritza per ser un sistema microvascular format per diferents tipus cel·lulars altament especialitzats. Les cèl·lules del sinusoides hepàtic es divideixen en cèl·lules parenquimals, els hepatòcits, que constitueixen més del 80% del volum hepàtic, i les cèl·lules no parenquimals (NPCs) entre les quals es troben les cèl·lules de Kupffer (KCs), les cèl·lules hepàtiques estrellades (HSCs), les cèl·lules endotelials sinusoidals (SECs) i les cèl·lules citotòxiques o *pit cells* [131,132] (**Figura 23**).

Les KCs constitueixen els macròfags residents del fetge. Es localitzen en el lumen sinusoidal a sobre les cèl·lules endotelials, emetent prolongacions citoplasmàtiques a l'espai de Disse subendotelial, així poden estar en contacte directe amb les HSCs i els hepatòcits. D'entre els diferents tipus cel·lulars hepàtics, les KCs són les principals cèl·lules responsables de la producció d'eicosanoids. Per aquest motiu, i ja que les KCs juguen un paper principal durant la fibrogènesi, s'amplia la seva caracterització en el pròxim apartat (veure apartat 1.4.1.1).

Les SECs constitueixen el 48% del total de les NPCs i formen la paret fenestrada dels sinusoides.

Les *pit cells* es localitzen, igual que les KCs, en el lumen sinusoidal i representen el 3% del total de NPCs. Són limfòcits granulars de gran grandària amb activitat citotòxica i són caracteritzades com les cèl·lules *natural killer* pròpies del fetge.

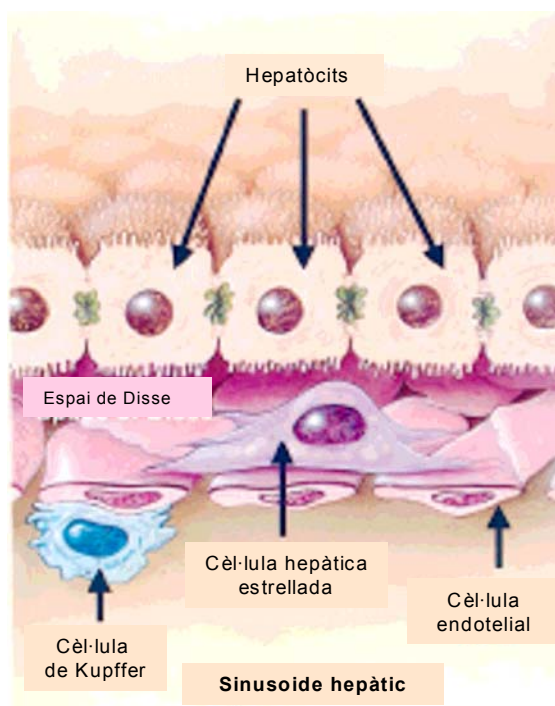


Figura 23. Estructura del sinusoides hepàtic (Figura adaptada de [133]).

Per últim, les HSCs representen el 20% del total de NPCs i es localitzen a l'espai de Disse entre els hepatòcits i les SECs. Les HSCs, anomenades antigament lipòcits, cèl·lules de Ito o cèl·lules perisinusoidals, van ser descrites per primera vegada el 1876 per Von Kupffer tot i que els estudis morfològics no es van realitzar fins més tard per *Ito, Popper, Wake et al.* [134]. Les HSCs es caracteritzen per presentar un reticle endoplasmàtic rugós i presentar un gran contingut de grànuls de vitamina A.

S'ha vist que cultius primaris de HSCs secreten col·lagen de tipus I, III i IV i també laminina. Aquestes cèl·lules van ser identificades com les principals cèl·lules productores de col·lagen en el fetge [135]. El dany hepàtic produeix una activació complexa de les HSCs amb el consegüent pas d'estat quiescent a estat activat. Diferents canvis morfològics acompanyen l'activació d'aquestes cèl·lules, incloent els canvis fenotípics a cèl·lula miofibroblàstica la qual expressa l'actina- α de múscul llis [α -SMA], un marcador ben establert d'activació de HSCs durant la fibrogènesi hepàtica], la nestina, la molècula d'adhesió cel·lular neuronal, i també es dona una pèrdua de vitamina A i un increment del reticle endoplasmàtic rugós.

Diverses alteracions metabòliques s'associen a l'activació de les HSCs d'entre les quals cal destacar l'increment de síntesi de DNA i la proliferació cel·lular. Canvis en el patró d'expressió gènica també són presents en l'activació, incloent un augment marcat del mRNA de col·lagen tipus I, tipus III i tipus IV [136].

1.4.1.1 Les cèl·lules de Kupffer (KCs)

Les cèl·lules de KCs reben el nom de l'anatomista alemany Karl W. Von Kupffer el qual va ser el pioner en la identificació de les cèl·lules sinusoidals hepàtiques [137].

Les KCs, que representen el 29% del total de NPCs, es localitzen en el lumen sinusoidal cosa que les fa ser les primeres cèl·lules del sistema fagocític mononuclear que entren en contacte amb el material particulat i immunoreactiu que arriba de l'absorció realitzada en el tracte gastrointestinal, per la qual cosa desenvolupen un paper important en els mecanismes de defensa de l'organisme i durant la inflamació [138].

Aquests macròfags hepàtics presenten una superfície cel·lular amb numerosos microvil·lis i invaginacions en forma de línies ondulades que semblen estar implicades en l'endocitosi [139]. El citoplasma de les KCs és ric en diferents vesícules intracitoplasmàtiques, presenta mitocòndries, un aparell de Golgi extens, un reticle endoplasmàtic rugós, i un conjunt de diferents estructures vacuolars i cossos densos que varien en forma, diàmetre i densitat, i que constitueixen l'aparell lisosomal àmpliament desenvolupat de les KCs [139].

El citoesquelet de les KCs està format per un sistema molt actiu de microfilaments i microtúbuls d'actina i miosina, així com filaments de vimentina, que permeten tant el manteniment de l'estructura cel·lular com el moviment de fagòcits i la migració cel·lular [140,141].

La identificació de les KCs es pot dur a terme per diferents tècniques:

a) Activitat peroxidasa endògena. Les KCs es distingeixen dels monòcits circulants per presentar activitat peroxidasa la qual es localitza específicament en el reticle endoplasmàtic i la membrana nuclear, a diferència dels monòcits que la seva expressió és a nivell lisosomal [142].

b) Tinció de l'activitat esterasa no específica característica dels macròfags. Aquesta tècnica cal combinar-la amb altres per poder diferenciar les KCs dels macròfags infiltrats al fetge [143].

c) Identificació immunohistoquímica de les KCs mitjançant anticossos monoclonals específics. Els anticossos més utilitzats són ED1 i ED2 essent ED1 específic de membrana lisosomal tant de macròfags residents com circulants a diferència de ED2 que és específic de les KCs [144].

En condicions fisiològiques, les KCs eliminen de la circulació sanguínia tot tipus de partícules estranyes, innecessàries o alterades mitjançant la fagocitosi. També participen en el metabolisme de les lipoproteïnes i desenvolupen un paper clau en el procés de captació i de destoxicació de l'endotoxina que arriba al flux venós portal [145].

Les KCs actuen també com a cèl·lules presentadores d'antigen, activant la resposta immunitària derivada dels limfòcits T [146,147], i a més poden desencadenar una resposta citotòxica semblant a la realitzada per les cèl·lules *natural killer* per tal d'eliminar les cèl·lules tumorals circulants [148].

L'activació d'aquests macròfags hepàtics produeix la secreció de mediadors biològics potents com és el cas dels radicals lliures derivats de l'oxigen, els intermediaris de nitrogen, els factors de creixement i diverses citoquines, quimioquines i eicosanoids [149].

1.4.2 BIOSÍNTESI D'EICOSANOIDS EN EL FETGE

1.4.2.1 Eicosanoids derivats de la COX

Com ja s'ha comentat anteriorment la KC és la principal productora de PGs en el fetge [149]. El principal producte alliberat per aquestes cèl·lules hepàtiques activades és la PGD₂ tot i que també produeixen nivells detectables d'altres PGs: PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ i TXA₂. No obstant, en resposta a determinats estímuls com el TNF α , l'INF γ de tipus II i alguns virus, es sintetitza principalment PGE₂ [149,150].

No consten moltes dades sobre la via de la COX en les SECs i les HSCs. S'ha vist que les SECs murines en cultiu no produeixen eicosanoids; no obstant, s'ha descrit que en presència d'AA lliure o estímuls com el TNF α o l'endotoxina, poden produir PGD₂, PGE₂, 6-ceto-PGF_{1α} i TXB₂ [151,152].

Les HSCs humanes no activades no presenten expressió de COX-2 a nivell proteic, no obstant, presenten el fenotip semblant al d'un miofibroblast i expressen constitutivament tant COX-1 com COX-2 quan s'activen en cultiu [153,154]. A més, estímuls com l'endotelina-1 o el TNF α indueixen la sobreexpressió de la COX-2 en aquestes cèl·lules [155]. Encara no s'han definit completament els prostanoids sintetitzats per les HSCs humanes i de rata, tot i que si que se sap que aquestes cèl·lules després de l'estimulació amb noradrenalina o ATP produeixen PGF_{2α} i PGD₂ [156]. Per altra banda, l'anafilotoxina C5a, que actua com un potent estimulador de la síntesi de prostanoids en les KCs, també és capaç d'induir la síntesi de PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} i TXB₂ en les HSCs [157,158].

Pel que fa als hepatòcits, s'ha vist que el lipopolisacàrid bacterià (LPS) i les diferents citoquines indueixen l'expressió de COX-2 en hepatòcits fetals mentre que en els hepatòcits adults es perd totalment la capacitat per induir aquest enzim [159].

1.4.2.2 Eicosanoids derivats de la 5-LO

Tradicionalment s'ha considerat la KC com la responsable de la síntesi de LTs en el fetge. La producció de LTB₄ en el fetge sembla ser casi exclusiva d'aquest tipus cel·lular [160]. La producció de LTB₄ per part dels hepatòcits sembla ser poc probable, de fet, no existeix cap evidència de la presència de LTA₄ hidrolasa en aquestes cèl·lules. No obstant, estímuls com l'alcohol poden alterar la degradació de LTs en els hepatòcits, alliberant al medi una substància d'estructura semblant al LTB₄ i amb propietats quimiotàctiques [161-163].

Pel que fa als cys-LTs, diferents treballs realitzats en el nostre laboratori han demostrat que en el sinusoides hepàtic només les KCs tenen la maquinària enzimàtica completa per sintetitzar aquests eicosanoids [164,165], és a dir, disposen de la 5-LO, la seva proteïna activadora FLAP (la unió a la 5-LO és necessària per la síntesi de LTs) i LTC₄ sintasa [165,166]. No obstant, i degut a què la LTC₄ sintasa no és exclusiva de KCs, sinó que a més es troba en els hepatòcits i en les SECs [164-166], no es pot descartar que part dels cys-LTs produïts en el fetge puguin originar-se per metabolisme transcel·lular. És a dir, el LTA₄ produït per les KCs pot ser captat pels hepatòcits, que són les cèl·lules hepàtiques que presenten els nivells més alts d'expressió de LTC₄ sintasa [167-169], i ser transformat a cys-LTs [164,166,168,169].

Existeixen poques dades sobre la via de la 5-LO i la biosíntesi de LTs en les SECs i les HSCs. Segons els estudis realitzats en el nostre laboratori les HSCs no són capaces de sintetitzar aquests eicosanoids [164,165]. Segons aquests estudis les HSCs funcionarien com les cèl·lules diana dels LTs, i de fet, s'ha observat que els cys-LTs actuen de forma paracrina sobre les HSCs induïnt la seva contracció i un increment de la concentració intracel·lular de Ca²⁺ [164]. En concret el LTD₄ generat durant la interacció dels hepatòcits amb les KCs, seria alliberat a l'espai de Disse a on s'uniria a receptors específics presents en les HSCs [164]. També s'ha descrit que les HSCs, igual que els hepatòcits, participen en la degradació del LTB₄ [170].

1.4.3 PAPER DELS EICOSANOIDS DURANT LA INFLAMACIÓ I FIBROSI HEPÀTICA

La síntesi d'eicosanoids es produeix normalment en les cèl·lules que participen en la resposta inflamatòria com són els neutròfils, macròfags i mastòcits. Ara bé, si ens centrem en el sinusoides hepàtic, les KCs serien la responsable d'aquesta síntesi [39]. Actualment existeixen nombroses evidències que demostren que l'activació de les KCs i l'alliberació d'eicosanoids per part d'aquests macròfags juguen un paper fisiopatològic important en la malaltia hepàtica [171]. Diversos estímuls com l'obesitat, el consum crònic d'alcohol, l'endotoxina o compostos procedents de la degradació de fàrmacs i xenobiòtics indueixen l'activació de les KCs [39].

Les KCs activades sintetitzen òxid nítric (NO), proteases, citoquines, radicals lliures de l'oxigen, anions superòxid i eicosanoids com la PGD₂, PGE₂ i LTs [39]. Alguns d'aquests productes són també estimuladors o inhibidors de la seva pròpia síntesi i la d'altres mediadors; per exemple, el TNF α estimula la síntesi de PGE₂, que a la vegada inhibeix l'alliberació de TNF α ; i l'INF de tipus II estimula la producció de PGE₂ i TNF α a la vegada que suprimeix la síntesi d'IL-1 [172]. De totes maneres l'alliberació desproporcionada d'aquests mediadors, juntament amb la secreció d'enzims lisosomals per part de les KCs, afavoreix el desenvolupament de necrosi cel·lular i inflamació en el teixit hepàtic. En la **Taula 4** es relacionen la síntesi i l'alliberació d'eicosanoids amb la patogènesi de la malaltia hepàtica.

Acció	Mediador
Hepatoprotecció	PGE ₂ , PGE ₁ , PGI ₂ ^[173-176]
Acumulació de triglicèrids	PGE ₂ ^[177]
↓NO, ↓TNF α , ↑IL-6	PGE ₂ ^[178,179]
↓Glicogenolisi	PGD ₂ , LTC ₄ , LTD ₄ ^[180,181]
Contracció de les HSCs	LTD ₄ ^[164]
Fibrosi hepàtica	LTC ₄ ^[165,182]
Hipertensió portal	TXA ₂ , cisteïnil-LT ^[164,183]

NO, òxid nítric; TNF α , Factor de Necrosi Tumoral alfa; IL-6, interleuquina 6; PGE₂, prostaglandina E₂; PGI₂, prostaciclina; PGD₂, prostaglandina D₂; LTC₄, leucotriè C₄; LTD₄, leucotriè D₄; TXA₂, tromboxà A₂.

Taula 4. Efecte dels eicosanoids en el fetge segons [171].

1.4.3.1 Fibrosi hepàtica

S'ha arribat al concepte que la inflamació és un component clau de l'etiologia de la fibrosi hepàtica perquè precedeix o coexisteix amb el desenvolupament d'alteracions de la matriu extracel·lular (MEC) hepàtica [184,185]. El procés inflamatori incontrolat juga un paper clau en el desenvolupament de la fibrosi hepàtica [133]. Cal destacar la participació dels eicosanoids durant el procés de la fibrosi hepàtica. Aquesta hepatopatia és el resultat final d'un procés inflamatori i de reparació del teixit que es produeix en resposta a una agressió externa del fetge. De forma molt resumida es podria dir que el fil d'esdeveniments que es desencadenen en resposta al dany hepatocel·lular comença per una resposta inflamatòria. La fibrosi hepàtica consisteix en l'acumulació de teixit connectiu en el fetge com a resultat d'un desequilibri entre la producció i la degradació de MEC produït per un dany hepàtic agut o crònic [184,185]. En els últims anys s'ha avançat molt en el coneixement dels mecanismes cel·lulars i moleculars que

provoquen aquesta complicació hepàtica. Si el dany hepatocel·lular s'allarga en el temps i la resposta inflamatòria no es resol adequadament es desencadenen processos de remodelació tissular amb la consegüent secreció inadequada de MEC i l'aparició de fibrosi.

A dins del sinusoides hepàtic, l'espai de Disse subendotelial separa els hepatòcits de l'endoteli sinusoidal i conté MEC de baixa densitat. Aquesta matriu proporciona suport cel·lular i permet el transport de soluts i factors de creixement. En un fetge normal l'estructura sinusoidal es presenta normal, amb les KCs inactivades, les HSCs amb grànuls de vitamina A i una resistència normal al flux sanguini [186] (**Figura 24A**). Durant el dany hepàtic les KCs s'activen, les HSCs es multipliquen i secreten proteïnes de MEC amb el consegüent canvi de composició d'aquesta, es dona una pèrdua dels microvil·lis dels hepatòcits i apoptosi, augmenta la resistència al flux sanguini a causa del tancament de l'endoteli fenestrat i en conjunt es deteriora la funció [186] (**Figura 24B**).

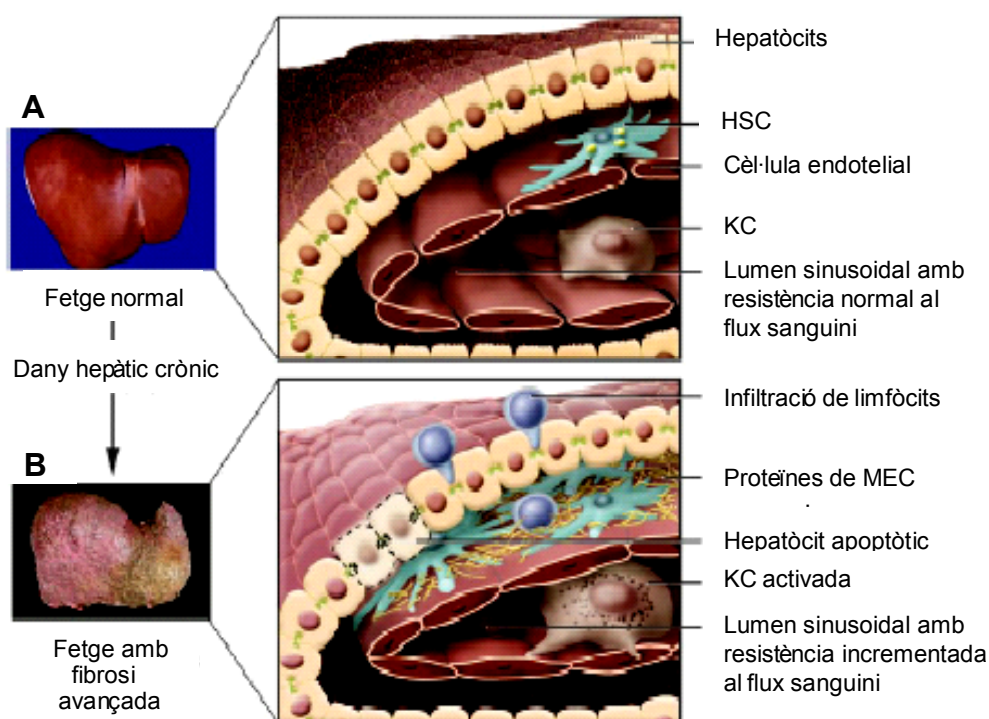


Figura 24. A) Estructura sinusoidal normal **B)** Estructura sinusoidal durant el dany hepàtic (Figura adaptada de [186]).

Degut a què les principals responsables de la secreció de proteïnes de MEC són les HSCs activades, l'activació i proliferació d'aquestes cèl·lules constitueix un procés clau en el desenvolupament de fibrosi hepàtica [131,186,187].

L'*activació* es refereix a la conversió de les cèl·lules quiescents emmagatzemadores de vitamina A a cèl·lules proliferatives fibrogèniques i miofibroblastes contràctils. Les HSCs són la principal font de col·lagen en la fibrosi patològica [135,188].

Les KCs, que constitueixen la major part de la població de macròfags residents en el cos humà, es consideren com una de les principals cèl·lules inflamatòries efectores les quals inicien la cascada inflamatòria que dóna lloc a la remodelació tissular i l'aparició de fibrosi [189,190,191].

En condicions normals, la població de KCs és capaç de proliferar localment i mantenir-se durant llargs períodes. Cal remarcar que s'ha observat un increment significatiu de la seva població durant les etapes inicials de la lesió hepàtica [192]. En el cas concret de la fibrogènesi induïda per tetraclorur de carboni (CCl₄), la població de KCs triplica el seu número original aproximadament entre les 6 i les 8 setmanes de tractament [192]. A més en aquest model experimental existeix una correlació molt estreta entre el número de KCs i el grau de desenvolupament de fibrosi [192-195].

Durant la progressió de la fibrosi es creu que les KCs promouen l'activació i proliferació de les HSCs, les cèl·lules fibrogèniques clau [131,187], a través de l'alliberament de factors paracrins (citoquines, eicosanoids i factors de creixement incloent el TGF-β1) fenomen que ha estat demostrat *in vitro* [196].

S'ha descrit que el medi condicionat procedent de cultius de KCs promou la proliferació de HSCs i la síntesi de col·lagen, proteoglicans i hialuronat [196-200], efecte que és més accentuat si les KCs es troben activades prèviament com és el cas de KCs procedents de fetges de rates tractades amb CCl₄ [199,200]. S'han identificat diferents compostos secretats per les KCs que poden exercir aquest efecte proliferatiu i estimulador de les HSCs, entre els quals cal destacar els eicosanoids, el TGF-β, el factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF), el TNF α , la IL-1 i l'INF de tipus II [131].

Les KCs activades modifiquen també altres processos metabòlics clau de les cèl·lules parenquimals, com és l'alliberació d'albumina per part dels hepatòcits que altera la funció hepàtica i contribueix al desenvolupament de lesió hepàtica.

Així doncs, els macròfags hepàtics participen de forma molt activa en l'inici i en la progressió de la fibrosi hepàtica alliberant factors solubles com citoquines, espècies reactives derivades de l'oxigen i eicosanoids [189-191].

De totes maneres cal destacar que els macròfags hepàtics juguen un paper dual però divergent, afavorint l'acumulació de MEC durant el procés de dany però al mateix temps augmentant la degradació de MEC durant la fase de recuperació [191].

1.4.3.2 Cirrosi hepàtica

En les fases més avançades de fibrosi hepàtica es dona una pèrdua histològica completa de l'arquitectura hepàtica donant lloc a la cirrosi la qual es caracteritza per la formació de septes i anells de fibra que rodegen els nòduls d'hepatòcits.

La cirrosi hepàtica és una malaltia amb una prevalença elevada en el món occidental i una de les principals causes de mort de la població adulta [201]. La cirrosi és l'estadi final de moltes malalties cròniques del fetge essent la conseqüència d'un procés inflamatori i de reparació de teixit que té lloc en resposta a una contínua agressió externa. Aquesta agressió pot consistir en una hepatitis viral (especialment hepatitis B i C), un abús d'alcohol o drogues, una malaltia metabòlica causada per un excés de ferro i coure, un atac autoimmune d'hepatòcits o d'epiteli dels conductes biliars o alguna anormalitat congènita [133,184] (**Figura 24**).

Quan es dona una acumulació de fluid a la cavitat peritoneal es produeix l'ascites. Ja el segle XVII l'investigador Richard Lower va ser el primer en relacionar l'ascites amb la hipertensió portal i al començament del segle XX diferents investigadors van observar una reducció de la concentració d'albumina plasmàtica en pacients amb cirrosi, particularment en aquells pacients amb ascites. L'acumulació de fluid en la cavitat abdominal en pacients amb cirrosi es va hipotetitzar que era el resultat de la hipertensió portal i la hipoalbuminèmia, amb un increment del flux limfàtic a través del conducte toràcic essent una altra conseqüència de l'augment del fluid extravasat dels capil·lars hepàtics i esplàcnics [202].

La demostració que la fibrosi hepàtica i, fins i tot, la cirrosi es poden revertir, ha accelerat l'entusiasme per desenvolupar noves teràpies antifibròtiques [203,204]. Recentment s'ha observat que es dona una regressió de la cirrosi en pacients amb hepatitis B, hepatitis C [205], hepatitis delta, malaltia metabòlica i colestasi entre d'altres. Un component clau en la reversió de la fibrosi és l'aclariment de les HSCs per apoptosi, la qual requereix d'una desregulació de TIMP-1 [206].

1.4.4 TERÀPIES ANTIFIBROGÈNIQUES

Diferents estudis preclínic en models experimentals han destacat un nombre de teràpies que poden disminuir específicament la fibrogènesi. Algunes d'aquestes teràpies s'ha dirigit a inhibir la síntesi de col·lagen, la deposició de MEC, la modulació de l'activació de les HSCs, l'estimulació de la degradació de la MEC o l'estimulació d'apoptosi de les HSCs. Un gran nombre d'aquests estudis preclínic han passat a assaigs clínics en humans [207] (**Taula 5**).

Agent	Malaltia	Mecanisme principal	Efecte antifibròtic en models experimentals	Efecte antifibròtic en assaigs en humans
Inhibidors del TGF- β	-	Antifibròtic	Resultats positius	No provat
INF α	HCV	Antifibròtic	Resultats positius	Efectiu en hepatitis C crònica
INF γ	HCV	Antifibròtic	Resultats positius	Efectiu en hepatitis C
Inhibidors del TNF α	Alcohol	Antiinflamatori	No provat	Efectiu en fibrosi induïda per alcohol
IL-10	HCV	Antiinflamatori	Resultats discrepants	Resultats aïllats en hepatitis C crònica
Antagonistes d'endotelina	-	Antifibròtic	Resultats positius	No provat
Antagonistes del receptor d'angiotensina	-	Antifibròtic	Resultats positius	No provat
Inhibidors de la norepinefrina	-	Antifibròtic	Resultats positius	No provat
Corticoesteroides	Hepatitis autoimmune i alcohòlica aguda	Antiinflamatori	No provat	Resultats positius
Gliotoxina	-	Antifibròtic	Resultats positius	No provat
Inhibidors de la 5-LO	-	Antifibròtic	Resultats positius en HSCs	No provat
Inhibidors de la FLAP	-	Antifibròtic	Resultats positius	No provat
Agonistes del PPAR	NASH	Antifibròtic	Resultats positius	Resultats aïllats en NASH
Sobreexpressió MMP-8	-	Antifibròtic	Resultats positius	No provat
Colxicina	Cirrosi biliar primària/alcohol	Antifibròtic	Resultats limitats	Resultats discrepants
Vitamina E	NASH/alcohol	Antioxidant	Resultats parcials	Resultats positius d'inhibició de l'activació de les HSCs
S-adenosil-metionina	Alcohol	Antioxidant	No provat	Efectiu en fibrosi induïda per alcohol
Fosfatidilcolina	Alcohol	Antioxidant	Resultats positius	No provat en fibrosi induïda per alcohol
Silimarina	Alcohol	Antifibròtic	Resultats positius	Resultats limitats
Plantes medicinals	-	Antifibròtic	Resultats positius	No efectiu

TGF- α i β , factor de creixement tumoral α i β ; 5-LO, 5-lipooxigenasa; FLAP, proteïna activadora de la 5-LO; HCV, virus de l'hepatitis C; NASH, esteatosi hepàtica no alcohòlica.

Taula 5. Principals fàrmacs antifibròtics desenvolupats pel tractament de la fibrosi hepàtica segons [186,207].

A la **Taula 5** es mostra un resum dels fàrmacs més utilitzats com a teràpia antifibròtica el qual s'ampliarà a continuació en el text. D'aquesta taula es dedueix que en el moment actual un antifibròtic específic que encaixi en el perfil d'un agent ideal (és a dir, que sigui potent, segur, oralment biodisponible i econòmicament assequible) no es troba encara disponible en el mercat.

1.4.4.1 Citoquines profibrogèniques i antifibrogèniques

La fibrogènesi és el resultat de diverses interaccions entre diferents tipus cel·lulars i citoquines; quan d'aquestes interaccions en resulta un balanç profibrogènic s'afavoreix la formació de fibra en el fetge. Diverses estratègies antifibrogèniques presenten com a diana la inhibició d'algunes citoquines.

La citoquina més profibrogènica que s'ha descrit en el fetge és el factor TGF- β [208,209]. El TGF- β juga un paper central en la cascada fibrogènica, és una diana terapèutica important. Quan el TGF- β es troba sobreexpressat en el fetge condueix a la producció de fibrosi [208] i a l'inhibir la seva expressió durant el dany hepàtic experimental es disminueix la fibrosi [210]. La disrupció de la síntesi de TGF- β i/o de les seves vies de senyalització prevenen la formació de fibra, fet que es dona durant la fibrosi hepàtica experimental [211]. S'han proposat diferents estudis d'inhibició del TGF- β els quals inclouen la utilització de molècules com la decorina (el component proteic central del proteoglicà, el qual s'uneix i inactiva el TGF- β [212]), anticossos contra TGF- β i receptors solubles que codifiquen per seqüències que uneixen al TGF- β actiu i prevenen la unió als seus receptors corresponents [212,213].

Uns quants mitògens semblen ser importants en l'estimulació de la proliferació de les HSCs d'entre els quals cal destacar el PDGF. Aquesta citoquina juga un paper clau en la proliferació cel·lular de les HSCs i d'altres tipus cel·lulars. Diversos estudis han demostrat que el PDGF acompanya a l'activació de les HSCs a través de la sobreexpressió dels seus receptors [214]. Per aquest motiu la neutralització de l'activitat del PDGF tant per antagonistes competitius com per bloqueig dels seus receptors, és una proposta terapèutica de gran interès.

També l'administració de factors de creixement (p. ex. el factor de creixement similar a insulina, el factor de creixement d'hepatòcits (HGF) i la cardiotrofina) o la seva administració com a teràpia gènica atenuen la fibrosi hepàtica experimental [215,216]. No obstant, aquests últims descobriments no han estat provats en humans i poden arribar a afavorir el desenvolupament de càncer.

A més cal destacar que diverses citoquines semblen poder inactivar les HSCs i presenten propietats antifibrogèniques. En aquest grup hi trobem l'INF γ [217], l'INF α [218], la proteïna associada a l'activació de HSCs [219] i possiblement l'adiponectina [220] i el HGF [215].

En concret l'adipocitoquina adiponectina inhibeix la proliferació induïda per el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) i atenua l'efecte del TGF- β 1 en les HSCs i per tant, condueix a la inhibició de la fibrogènesi [220].

La principal citoquina antifibròtica que s'ha vist que inhibeix la síntesi de col·lagen en diferents models experimentals de fibrosi hepàtica és el INF γ [207,218,221]. La família dels INFs està formada per tres isoformes principals que inclouen el INF α , β i γ . Cada una d'aquestes

isoformes és única no només en termes d'estructura proteica sinó també d'acció biològica. Existeixen moltes isoformes de l'INF α , mentre que només sembla existir una única isoforma de l'INF β i γ . L'INF α té un efecte antiviral molt més potent que l'INF γ . No obstant, s'ha demostrat que l'INF γ inhibeix específicament la síntesi de MEC en fibroblasts [222]. Diferents estudis han demostrat que el INF γ té efectes potents sobre les HSCs ja que inhibeix diferents aspectes de l'activació d'aquestes cèl·lules [217,223]. En referència a la utilització de INF γ en el tractament de la fibrogènesi hepàtica, existeix una preocupació sobre el seu ús a causa de que la seva sobreexpressió en el fetge porta a l'hepatitis crònica [224] i degut també als seus efectes potencials secundaris a llarg termini relacionats amb els seus efectes immunomodulatoris. No obstant, un informe recent de pacients amb infecció crònica per hepatitis C i fibrosi suggereix que el compost és segur i ben tolerat i que un subgrup de pacients arriben a presentar resposta antifibròtica [225]. Tot i que aquest estudi pilot proporciona les bases per la utilització del INF γ en pacients, s'han de realitzar més estudis per documentar el seu potencial terapèutic.

Actualment s'han realitzat diversos estudis pilot per examinar l'efecte de compostos anti-TNF α en pacients amb malaltia hepàtica induïda per l'alcohol [226-229]. El fonament d'aquestes teràpies és que el TNF α es troba sobreexpressat en fetges afectats per l'alcohol, i així aquests compostos anti-TNF α haurien de disminuir la inflamació que és el primer pas cap a la fibrosi. Tot i que existeixen pocs resultats sobre l'efecte d'aquestes intervencions en la fibrosi hepàtica, anàlisis preliminars en pacients amb hepatitis alcohòlica severa suggereixen una disminució de la inflamació i del dany agut, els quals presumiblement precedeixen a la fibrosi en aquesta malaltia [228]. Malgrat aquests resultats, la utilització d'aquests compostos requereix una gran precaució perquè poden incrementar el risc d'infeccions greus [230].

També la utilització de IL-10 està actualment sota investigació en pacients amb hepatitis C amb fibrosi avançada els quals han rebutjat la teràpia antiviral [231,232]. De totes maneres el paper de la IL-10 no està del tot definit en els diferents models de fibrosi hepàtica. Per un costat s'ha vist que la IL-10 pot actuar com a possible teràpia antifibròtica en rates [233] mentre que per l'altre pot arribar a promoure la fibrosi hepàtica en un model murí d'inflamació i fibrosi [234]. A més els antagonistes dels receptors de les quimioquines semblen prometadors en models animals d'inflamació i malaltia autoimmune [235].

1.4.4.2 Pèptids biològicament actius: bloqueig dels receptors d'endotelina-1, inhibició del sistema renina-angiotensina i bloqueig del sistema adrenèrgic.

S'ha descrit en la literatura un ampli espectre de pèptids vasoactius d'entre els quals cal destacar l'endotelina-1 i l'angiotensina II que presenten efectes pleiotròpics a nivell biològic i

molecular, i que poden estar implicades en la fibrogènesi hepàtica [236-238]. Ja que aquests compostos també presenten propietats vasoactives, s'obre una possible porta terapèutica si es pogués arribar a tractar al mateix temps la fibrogènesi i la hipertensió portal.

Les HSCs expressen tant angiotensina II com els receptors d'endotelina, i l'estimulació d'aquests receptors amb els seus corresponents lligants desencadena efectes importants en aquestes cèl·lules [238]. La inhibició de la via de l'endotelina porta a una disminució de la fibrogènesi [237]. El bloqueig dels receptors d'endotelina-1 tipus A conjuntament amb l'administració de vasodilatadors (PGE_2 i donadors de NO) exerceixen activitat antifibròtica en rossegadors, tot i que no s'han provat els efectes en humans [239].

De la mateixa manera, el bloqueig de la funció de l'angiotensina II *in vivo* amb inhibidors de l'enzim de l'angiotensina, antagonistes del receptor de l'angiotensina 2, també produeix una inhibició de l'activació de les HSCs i de la fibrosi [240]. Els inhibidors del sistema renina-angiotensina són àmpliament utilitzats com a agents antifibròtics en pacients amb malaltia crònica renal i cardíaca i semblen ser segurs quan són administrats durant llargs períodes de temps [241].

Altres pèptids biològicament actius també són importants durant la mediació de la fibrogènesi hepàtica. En aquest grup hi trobem compostos involucrats en el sistema adrenèrgic (p. ex. la norepinefrina) els quals semblen ser profibrogènics [242,243]. Per tant, el bloqueig d'aquests compostos també reduiria la fibrosi. Per exemple, l'exposició de rates amb dany hepàtic a la 6-hidroxidopamina, una toxina que destrueix les fibres noradrenèrgiques, disminueix significativament la fibrosi [242]. A més, ratolins deficients per la dopamina β -hidroxilasa els quals no poden produir norepinefrina són resistents a la fibrogènesi [243].

1.4.4.3 Antiinflamatoris

Degut a què la inflamació precedeix i promou la progressió de la fibrosi hepàtica, s'ha proposat la utilització de fàrmacs antiinflamatoris com a teràpia antifibrogènica. Els corticosteroides només estan indicats pel tractament de la fibrosi hepàtica en pacients amb hepatitis autoimmune i hepatitis alcohòlica aguda [244].

A més, la inflamació activa i prolongada que es dona durant el desenvolupament de la fibrosi i la cirrosi hepàtica pot arribar a provocar una sobreexpressió de l'isoforma induïble de la COX, la COX-2, com s'ha vist durant el progrés de la cirrosi hepàtica humana [245,246]. També la COX-2 està associada amb la progressió de la fibrosi hepàtica durant la infecció crònica per hepatitis C [247]. Cal afegir que s'ha demostrat que la isoforma COX-2 està sobreexpressada en el context del dany necroinflamatori en rates amb malaltia alcohòlica hepàtica experimental i en rates sotmeses a una dieta deficient en colina [248-250]. Aquests resultats indiquen que la

COX-2 és una diana atractiva en el fetge, i consegüentment, els inhibidors selectius de COX-2 desenvolupats recentment poden representar una estratègia terapèutica innovadora per la prevenció de la inflamació i la fibrosi hepàtica. De fet, els inhibidors selectius de la COX-2 són efectius en la prevenció dels desordres fibròtics, incloent la fibrosi intersticial renal, la fibrosi testicular i la fibrosi de la submucosa oral [251-253].

1.4.4.4 Inhibició de la proliferació cel·lular i estimulació d'apoptosi en KCs i HSCs

La presència d'un número elevat de KCs activades és considerat un esdeveniment crític en l'inici de la cascada inflamatòria que dona lloc a la fibrosi hepàtica [38,165,192]. S'ha vist que els macròfags juguen un paper important en el desenvolupament de la inflamació hepàtica i la supressió selectiva durant la progressió del dany hepàtic podria resultar una bona teràpia antiinflamatòria. També s'ha vist que la reducció de la supervivència de les KCs per inhibició de la via de la 5-LO està associada a un efecte antifibròtic remarcable [165,190].

El control de la proliferació i apoptosi de les HSCs és un esdeveniment clau en la regulació de la progressió de la fibrosi hepàtica. En concret, diverses estratègies basades en la inhibició de l'acumulació de les HSCs activades modulant tant la seva activació i/o proliferació com promovent la inducció a apoptosi, han demostrat ser una proposta potencial antifibròtica [186,189,254,255].

S'ha vist que la gliotoxina que induïx apoptosi en les HSCs de rata redueix la fibrosi en rates induïdes a un dany hepàtic amb CCl₄ [255]. Altres estudis han demostrat que els inhibidors selectius de la 5-LO i de la FLAP, el AA861 i el Bay-X-1005 respectivament, redueixen significativament el número de KCs en cultiu i induïxen apoptosi en aquestes cèl·lules. En un model *in vivo* d'inducció a fibrosi amb CCl₄ en rates també es va demostrar que l'administració de l'inhibidor de la FLAP reduïa la fibrosi hepàtica [165].

1.4.4.5 Agonistes del PPAR α i γ

Els PPARs són una família de factors transcripcionals nuclears activats per lligant que pertanyen a la superfamília de receptors nuclears d'hormones [256]. Els PPARs juguen un paper important en la regulació de l'homeòstasi lipídica, la diferenciació i la proliferació cel·lular, la biologia vascular, el càncer i la inflamació [257].

La regulació transcripcional per PPARs es dona per unió a elements reguladors específics situats en regions no codificants del gen diana. En presència de proliferadors peroxisomals (PPs) els quals actuen com a lligants del PPAR, s'activen aquests receptors i dimeritzen amb el

receptor de l'àcid retinoic (RXR). El dímer PPAR-RXR pot entrar a nucli a on s'uneix a elements de resposta de proliferadors peroxisomals (PPRE), que es troben en regions no codificants del promotor del gen diana, per tal d'iniciar l'activitat transcripcional [258,259] (**Figura 25**).

S'han identificat tres famílies de PPARs en mamífers: PPAR α , β (també anomenat δ o NUC1) i γ les quals estan codificades per diferents gens [259].

El PPAR α s'expressa en abundància en fetge, múscul esquelètic, ronyó, teixit adipòs marró, cor i paret vascular. En el fetge el PPAR α és el mitjancer central del metabolisme lipídic.

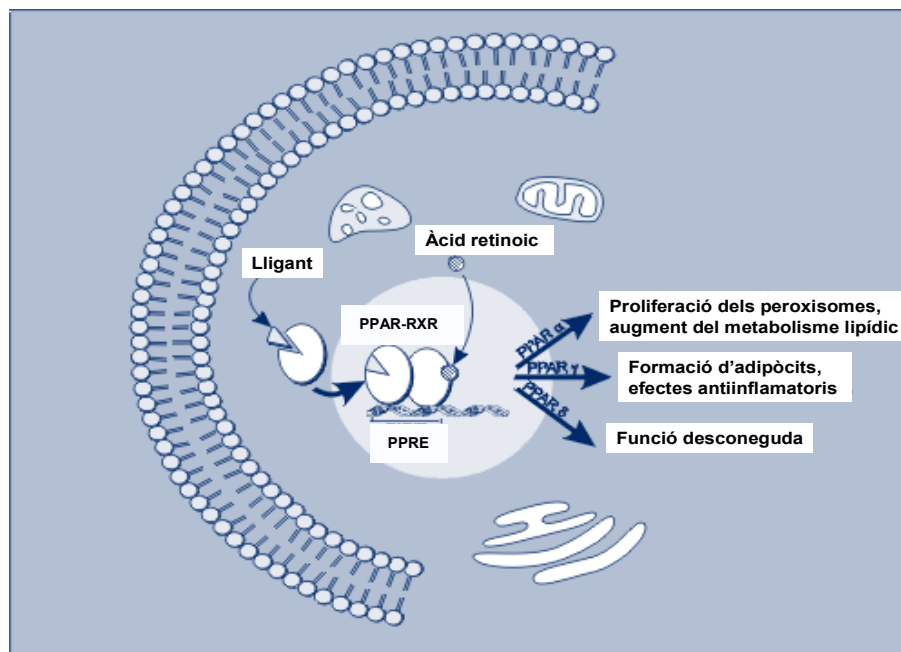


Figura 25. Activació dels PPARs

El PPAR γ s'expressa en dues variants de *splicing* PPAR γ 1 i PPAR γ 2. El PPAR γ 1 s'expressa principalment en teixit adipòs, colon, melsa, retina i cèl·lules hematopoietiques. En contrast el PPAR γ 2 s'expressa en teixit adipòs blanc i marró [260]. El PPAR β/δ s'expressa en molts teixits però és present de manera més abundant en intestí, ronyó i cor [261].

Els PPARs són factors de transcripció depenents de lligant: l'activació de la transcripció dels gens diana depèn de la unió del lligant a aquest receptor. Alguns lligants són compartits per les tres isoformes com és el cas dels àcids grassos poliinsaturats i dels àcids grassos oxidats. Nombrosos compostos s'uneixen amb alta afinitat al PPAR α , incloent els àcids grassos endògens insaturats de cadena llarga, com l'àcid linoleic i l'àcid linolenic conjugat entre d'altres, i eicosanoids, com el 8S-HETE i el LTB $_4$, i fàrmacs d'utilitat clínica com és el cas de les tiazolidinediones (TZDs) i els fibrats [54, 259,261,262].

El PPAR γ és un factor de transcripció activat per lligant amb un domini d'unió a DNA que reconeix elements de resposta en el promotor de gens diana específics lligats a inflamació, proliferació cel·lular, apoptosi i diferenciació [263-266].

El PPAR γ pot ser activat per diversos lligants: les TZDs, que actuen com a lligants sintètics del PPAR γ ; diversos eicosanoids incloent el 12 i 15-HETE; i els productes de la COX: PGA₁, PGA₂, PGD₂ i el producte de deshidrogenació de la PGD₂, la 15d-PGJ₂ que s'ha identificat com el lligant natural més potent del PPAR γ [257].

En concret, s'ha vist que el PPAR γ s'expressa en HSCs i juga un paper important en la progressió de la fibrosi hepàtica ja que l'activació de les HSCs està associada amb la reducció tant de l'expressió com de l'activitat transcripcional d'aquest receptor nuclear [254,267]. S'ha demostrat que els lligants sintètics del PPAR γ en HSCs activades en cultiu recuperen l'expressió d'aquest receptor nuclear i reverteixen aquestes cèl·lules activades a un fenotip quiescent [254,267,268].

In vivo, l'administració de lligants sintètics del PPAR γ (p. ex. les TZDs) a models animals de fibrosi hepàtica redueix efectivament la transdiferenciació de les HSCs i la deposició de col·lagen [269].

A més les TZDs exerceixen un efecte beneficiós en la fibrosi hepàtica experimental [270]. S'ha vist en un estudi preliminar en pacients amb esteatohepatitis no alcohòlica (NASH) que el tractament amb l'agonista del PPAR γ rosiglitazone disminuïa tant l'esteatosi com la fibrosi [271].

1.4.4.6 Inhibició de les MMPs

Un fet destacat de la fibrosi hepàtica és la renovació de la MEC, incloent no només la seva síntesi, sinó també la seva degradació [272]. Durant la progressió de la fibrosi es dona un increment de l'expressió de les MMPs i en concret dels TIMPs.

Les MMPs són una família d'endopeptidases Ca²⁺ depenents que estan implicades en la degradació fisiològica i patològica de la MEC. Les MMPs poden degradar un ampli ventall de proteïnes de matriu continguin o no col·lagen [273]. Totes les MMPs són secretades per les cèl·lules com a proenzims catalíticament inactius (pro-MMPs), els quals comparteixen una estructura modular que consisteix amb un prodomini N-terminal d'uns 80 aa, un domini catalític d'uns 170 aas i un domini carboxi-terminal d'uns 200 aas. Aquestes MMPs latents requereixen d'activació perquè puguin degradar els components de la MEC. En el prodomini s'hi troba el residu de Cys73 el qual funciona com a estabilitzador de la isoforma inactiva. En el domini catalític hi trobem un Zn²⁺ actiu el qual s'uneix amb el residu de Cys del prodomini. Quan la

unió de la Cys73-Zn²⁺ és intacta la MMP és inactiva. L'activació de les MMPs implica el trencament de la unió entre el Zn²⁺ del centre actiu i el residu de Cys [274].

Existeixen diferents grups de MMPs [273]:

1. Les col·lagenases: MMP-1, MMP-8 i MMP-13. Digereixen principalment col·lagen intersticial de tipus I, II i III.
2. Les gelatinases: MMP-2 i MMP-9. Digereixen principalment gelatina.
3. Les estromelisinases: MMP-3, MMP-10 i MMP-11. Digereixen compostos de la MEC com el col·lagen IV i la fibronectina. Aquest grup també inclou la matrilisina (MMP-7).
4. Les MMPs de membrana (MT-MMP). Digereixen principalment gelatina, fibronectina i laminina.
5. La resta de MMPs s'inclouen a dins d'un subgrup heterogeni format per: MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 i MMP-28.

L'activitat de les MMPs està regulada per diferents tipus d'inhibidors dels quals en cal destacar els TIMPs. Gràcies a aquesta combinació de mecanismes, la degradació de la MEC és regulada finament i d'aquesta manera s'evita el dany tissular.

S'ha vist que l'activitat de les MMPs està relacionada estretament amb la severitat de la fibrosi hepàtica [273]. En les fases agudes de dany hepàtic i durant la progressió de fibrosi, hi ha un increment d'expressió de les MMPs. Aquestes molècules estan involucrades en la regulació de la degradació de la MEC hepàtica tant la normal com la fibròtica. Les tres MMPs més importants en el fetge són la MMP-2, la MMP-9 i la MMP-3 [272].

S'ha observat un increment de l'expressió de MMP-2 i de MMP de membrana tipus 1 com també de TIMP-1 i TIMP-2 durant la fibrogènesi [272,275-277]. Existeixen evidències d'un increment de l'expressió del proenzim de la MMP-2 i del seu enzim actiu en models animals i humans de fibrosi hepàtica. Més evidències s'han vist en el model de rata d'inducció a la fibrosi hepàtica amb CCl₄ on existeix una clara relació entre la progressió de la fibrosi hepàtica, l'increment del proenzim de la MMP-2 i l'increment del contingut de la forma activa de la MMP-2 [275]. Un augment de la MMP-9 també s'ha vist en fetges de rata induïdes a fibrosi en un model de lligadura del conducte biliar, suggerint que aquest enzim també juga un paper important en aquesta patologia [278].

La sobreexpressió dels TIMPs contribueix en particular al fenotip profibrogènic [272]. Interessantment, la sobreexpressió de MMP8 condueix a la reversió parcial de la fibrosi, per tant una sobreexpressió de MMPs podria arribar a tenir un paper terapèutic [279].

1.4.4.7 Colxicina

La colxicina és un alcaloide de planta que inhibeix la polimerització dels microtúbuls, un procés que es requereix per la secreció de col·lagen. Per aquest motiu la colxicina s'engloba a dins dels compostos antifibròtics. A més, diverses evidències defensen les propietats antifibròtiques de la colxicina en models experimentals animals [280], de la mateixa manera que s'ha estudiat en un gran nombre d'assaigs clínics [281-284] incloent la cirrosi biliar primària, la cirrosi induïda per alcohol, com també en altres malalties hepàtiques d'origen divers [282].

Un assaig clínic amb colxicina a doble cec, aleatori i controlat es va realitzar en pacients amb cirrosi biliar primària. Es van notar millores en un gran nombre de marcadors bioquímics, però la colxicina va fallar a l'hora de disminuir la fibrosi [281]. En un altre assaig a doble cec, aleatori i controlat on s'estudiava la colxicina vs placebo en pacients amb diverses malalties hepàtiques, es va veure que la colxicina millorava la fibrosi com també es donava una millora de la supervivència [282]. No obstant, aquest estudi ha estat criticat per causes metodològiques perquè molts pacients no se'ls hi va fer un seguiment continuat i perquè es va donar un excés de mortalitat inexplicable en el grup control per causes no relacionades a la malaltia hepàtica. En un metanàlisi que incloïa 1138 individus amb fibrosi alcohòlica i no alcohòlica i cirrosi es va trobar que la colxicina no reduïa ni la fibrosi ni la mortalitat dels pacients [283]. En un altre estudi multicèntric recent que incloïa 549 pacients amb cirrosi alcohòlica avançada a on es comparava l'administració de colxicina (0.6 mg oral dues vegades/dia) amb placebo no es va veure cap efecte del tractament actiu sobre la supervivència [284]. Per tant, la colxicina no és recomenada a pacients amb cirrosi alcohòlica avançada. En conclusió, la colxicina és un compost segur i pot produir una millora dels marcadors de malaltia hepàtica, inclòs pot millorar la mortalitat dels pacients. No obstant, l'ineficàcia a l'hora de disminuir la fibrosi hepàtica fa que aquest medicament esdevingui un antifibròtic problemàtic.

1.4.4.8 Antioxidants

Ja que el paper de l'estrès oxidatiu en el dany i en l'activació de les HSCs i en l'estimulació de la producció de MEC és important, els antioxidants han rebut una atenció considerable com a antifibròtics. Diversos antioxidants com la vitamina E, la silimarina, la fosfatidilcolina i la S-adenosil-L-metionina inhibeixen l'activació de les HSCs, protegeixen els hepatòcits de patir apoptosi i atenuen la fibrosi hepàtica experimental [286]. Els antioxidants exerceixen efectes beneficiosos en pacients amb malaltia hepàtica induïda per alcohol i NASH [286,287].

La vitamina E ha estat examinada tant en models animals [288-292] com en assajos clínics. El precursor de la vitamina E, el d- α -tocoferol (1200 IU/dia durant 8 setmanes), va ser administrat

a 6 pacients infectats pel virus de l'hepatitis C (HCV) que no van respondre a la teràpia amb INF [289]. El d- α -tocoferol va produir una inhibició dels paràmetres d'activació de les HSCs, no obstant, no va disminuir els nivells de fibrosi. En un altre assaig clínic controlat i aleatori es van estudiar els efectes de la vitamina E en pacients amb una hepatitis induïda per alcohol de grau lleu a moderat i es va trobar que la vitamina E disminuïa els nivells d'àcid hialurònic en el sèrum, però no produïa un canvi en els nivells de col·lagen de tipus III [291]. La teràpia antioxidant, incloent la vitamina E, en pacients amb hepatitis severa induïda per alcohol, no va tenir efecte en el resultat, tot i que la fibrosi no era l'objecte específic d'estudi [292].

La S-adenosilmetionina (SAM) és important en la síntesi de l'antioxidant, glutatió. Des de que es va proposar que el SAM tenia propietats antioxidants en el fetge, i que l'expressió de l'enzim responsable de la seva síntesi (la metionina adenosiltransferasa) es trobava disminuït durant la lesió hepàtica [293], s'ha estudiat el SAM en un gran nombre d'assaigs clínics en pacients amb cirrosi induïda per alcohol. La valoració histològica de la fibrosi no es va mesurar específicament, tot i que es va veure una millora en la mortalitat total/necessitat de trasplantament de fetge especialment en pacients cirròtics amb un *Child A/B*, cosa que augmenta la possibilitat d'una millora de la fibrosi [294].

1.4.4.9 Polienilfosfatidilcolina (PP)

La polienilfosfatidilcolina (PP), una barreja de fosfatidilcolines poliinsaturades que s'extreu de les llavors de soja, ha guanyat interès recentment com a agent antifibròtic particularment durant la lesió hepàtica induïda per alcohol, ja que aquesta malaltia sovint es troba associada amb l'estrès oxidatiu. Pel seu costat l'estrès oxidatiu porta a la peroxidació lipídica, al dany cel·lular i a la inflamació. Com que la fosfatidilcolina és un component important de la membrana cel·lular, aquesta substància podria actuar com a suplement de protecció de les membranes i podria produir una disminució del dany cel·lular i de la fibrogènesi. Diverses dades experimentals donen suport a aquesta idea [295]. Gràcies a la disposició de resultats experimentals sobre la seguretat aparent de la PP, es va realitzar un assaig clínic examinant els seus efectes en pacients amb hepatitis induïda per alcohol [296]. Aquest assaig clínic multicèntric, prospectiu, aleatori, a doble cec i controlat per placebo va examinar a 789 individus alcohòlics (la mitjana d'administració d'alcohol era de 16 begudes/dia). Els individus de l'estudi es van distribuir de manera aleatòria en dos grups segons si rebien la PP o placebo i la durada de l'assaig va ser de 2 anys. Encara que la majoria dels individus disminuïen substancialment el consum d'etanol durant l'assaig, la PP va fallar a l'hora de millorar de manera significativa la fibrosi.

1.4.4.10 Silimarina

Els extractes de silimarina, derivats de la llet de *Silybum marianum* (el compost actiu principal és la silibinina) disminueixen la peroxidació lipídica i inhibeixen la fibrogènesi en models animals [297,298], inclòs en babuïns [299]. Aquest compost també s'ha provat en diversos assaigs clínics molt ben desenvolupats en humans, tot i que el grau de fibrosi no va ser utilitzat com a resultat. S'ha vist que la silimarina és segura, però presenta efectes mixtes [300,301]. En un estudi es va veure una millora en la mortalitat especialment en el subgrup dels pacients alcohòlics. Aquests resultats juntament amb els obtinguts en estadis primerencs de cirrosi va semblar que la silimarina podia ser beneficiosa. No obstant, en un altre estudi focalitzat només en pacients alcohòlics, no es va poder veure cap millora en la supervivència. Així doncs, tot i que la silimarina és un compost segur en l'actualitat falten més resultats que recolzin els seus efectes beneficiosos.

1.4.4.11 Compostos derivats de plantes

Diferents compostos herbacis, molts d'ells utilitzats tradicionalment en països asiàtics per tractar les malalties hepàtiques, s'ha demostrat en models animals que presenten propietats antifibròtiques [302]. S'inclouen en aquest grup la *Sho-saiko-to*, la *glicirrhizina* i la *salvia miltiorhiza*.

Els medicaments que contenen herbes del gènere de la *Salvia* han estat populars com a antifibròtics [303]. Tot i que els assaigs clínics han suggerit poca efectivitat dels medicaments herbacis específics en alguns estudis [303] els resultats de les revistes asiàtiques queden pendents de revisar. Ja que se sap que aquests medicaments herbacis poden presentar una toxicitat significant, incloent hepatotoxicitat [304] aquests medicaments s'han d'utilitzar amb precaució.

1.4.4.12 Substàncies que inhibeixen les vies de transducció de senyal

Diverses substàncies descrites com a inhibidores de les vies clau de transducció de senyal involucrades en la fibrogènesi hepàtica també presenten un cert potencial pel tractament d'aquesta patologia [305]. Entre elles cal destacar la pentoxifilina (inhibidora de la fosfodiesterasa), l'amilorida (inhibidora de la bomba de Na^+/H^+) i l'àcid S-farnesiltiosalicílic (l'agonista de Ras) [186].

1.4.4.13 Disminució del col·lagen

La inhibició de la producció de col·lagen i/o la promoció de la seva degradació [305] és una altra estratègia antifibrogènica. Els inhibidors de la prolil-4 hidrolasa i l'halofuginona prevenen el desenvolupament de la cirrosi hepàtica experimental inhibint la síntesi de col·lagen. La MMP-8 i l'activador del plasminogen tipus uroquinasa estimulen la degradació del col·lagen *in vivo*. De totes maneres cal tenir en compte que l'eficàcia d'aquests fàrmacs és desconeguda i poden presentar efectes secundaris indesitjats.

1.4.4.14 Inhibició de la contractilitat

L'activació de les HSCs es troba associada amb un increment considerable de les proteïnes que són característiques de les cèl·lules contràctils (p. ex. α -SMA i les miosines de múscul llis [306,307]). La contracció de les HSCs és important durant el dany hepàtic perquè pot contribuir a col·lapsar i encongir els fetges cirròtics, i perquè també sembla jugar un paper en la hipertensió portal [238]. Per aquest motiu, la contractibilitat de les HSCs, tot i que no es troba relacionada de manera directa amb la fibrosi, constitueix una diana fisiològica important.

1.4.4.15 Tractament amb cèl·lules mare mesenquimals

Finalment, està per establir si el tractament amb cèl·lules mare mesenquimals pot arribar a disminuir la fibrosi experimental induïda, la qual cosa suggeriria un tractament potencial per les malalties hepàtiques cròniques [308,309].