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

Anna Planagumà Ferrer

Discussió

5 DISCUSSIÓ

La majoria de les estratègies antiinflamatòries actuals es centren en la inhibició farmacològica de la COX. L'ASA és el compost estrella dels AINEs i s'utilitza àmpliament per disminuir la inflamació, el dolor (de lleu a moderat) i la febre [312]. S'utilitzen dosis baixes d'ASA com a agent antitrombogènic per a la prevenció de l'infart de miocardi tot i que també s'ha vist que aquest AINE exerceix una acció protectora important en el càncer de colon esporàdic [312,313].

Durant la ingestió d'ASA, el seu compost actiu, l'àcid acetilsalicílic, és absorbit per la part superior de l'intestí prim i sistemàticament és ràpidament metabolitzat per hidròlisi enzimàtica en el seu primer pas a través de la circulació portal [314]. Si ens centrem en el context del fetge, l'ASA és hidrolitzada per les esterases les quals són abundants en les cèl·lules parenquimals hepàtiques i específicament en la mitocòndria i el reticle endoplasmàtic dels hepatòcits [315,316]. Les cèl·lules hepàtiques converteixen la majoria del salicilat a conjugats solubles en aigua (p. ex. èster i glucurònic èter, àcid salicilúric o àcid gentísic), els quals són ràpidament aclarats pels ronyons [315,316]. Ja que tota la sang que irriga el tracte intestinal entra en el fetge a través de la vena porta i un 73% de l'ASA es converteix a salicilat després de 30 minuts de la seva ingestió [317], la concentració d'àcid acetilsalicílic en el fetge probablement excedeix a la concentració en sèrum i en altres teixits. Per tant, sembla raonable de creure que aquest AINE acetilador exerceix un impacte superior en la formació de LXs en cèl·lules hepàtiques que en altres tipus cel·lulars. De fet, estudis previs realitzats en el nostre laboratori van demostrar que els nivells de 15-epi-LXA₄ estaven incrementats significativament en fetges de rates tractades amb dosis farmacològiques d'ASA [108]. També es va veure que la formació de 15-epi-LXA₄ derivada d'ASA en el fetge podia provenir de rutes transcel·lulars: els hepatòcits de rata exposats a ASA van produir un canvi en la síntesi d'eicosanoids passant del principal producte derivat de la COX, el TXB₂, al 15-HETE, el qual serà transformat a altres

compostos [108]. Es va observar que el 15-HETE derivat d'hepatòcits, que disposa d'un carboni racèmic a la posició 15 (una barreja de 15S- i 15R-HETE), era subsegüentment transformat per la 5-LO de les KCs a LXA₄ i 15-epi-LXA₄ [109]. Aquest efecte era específic de l'ASA i no es va observar amb altres AINEs com l'indometacina, l'ibuprofè, el valeril salicilat o el nimesulfit. Ja que els hepatòcits adults de rata no expressen COX-2 [108] altres fonts de 15R-HETE independents de la COX-2 acetilada per l'ASA han estat involucrades. El citocrom P450 seria l'enzim que jugaria un paper important en la síntesi d'aquest intermediari.

Els resultats del primer estudi del present treball ens indiquen que en el sinusoides hepàtic, la formació de 15-epi-LXA₄ derivada d'ASA a través de fonts endògenes d'AA es dona en un únic tipus cel·lular, les KCs. De fet, al incubar les KCs amb ASA es van detectar quantitats significatives de 15-epi-LXA₄. També es va observar en aquestes cèl·lules que l'ASA produïa un canvi en el metabolisme de l'AA el qual passava de la via de la COX a la via de la LO donant-se una disminució dels nivells de PGE₂ amb un consegüent augment dels nivells de LTB₄. A més cal afegir que abans que l'ASA s'hidrolitzi a salicilat i entri en la circulació sistèmica afavoreix en les KCs el metabolisme de l'AA cap a la formació de compostos antiinflamatoris endògens biològicament actius, el 15R-HETE i la 15-epi-LXA₄ [108]. Interessantment en KCs exposades a ASA es va observar una relació inversa entre els nivells de 15-epi-LXA₄ derivada d'ASA i els nivells de PGE₂. Ja que les KCs disposen tant de l'enzim COX-2 com de 5-LO, la formació en aquests macròfags residents del fetge de 15-epi-LXA₄ derivada de l'ASA pot tenir lloc per la interacció de la COX-2 acetilada amb la 5-LO, o per conversió via transcel·lular del 15R-HETE alliberat pels hepatòcits. Independentment de l'origen cel·lular d'aquest compost antiinflamatori, les cèl·lules hepàtiques en general són una font rica de 15-epi-LXA₄ durant el tractament amb ASA. La 15-epi-LXA₄ pot exercir activitat antiinflamatòria de forma autocrina i paracrina, contribuint a l'ampli rang d'accions beneficioses que presenta l'ASA.

Com la majoria d'eicosanoids, les LXs i la 15-epi-LXA₄ derivada de l'ASA són sintetitzades i metabolitzades ràpidament. Per tant, un cop generades en el sinusoides hepàtic, s'espera que

aquests compostos antiinflamatoris funcionin com a autocoids lipídics i exerceixin accions potents en les cèl·lules hepàtiques veïnes. En el primer estudi també es va veure que l'activitat de la 5-LO en els macròfags del fetge era inhibida per la LXA₄, un efecte semblant a l'exercit per la PGE₂ en neutròfils humans [318]. Aquests resultats suggereixen que les LXs també poden jugar un paper actiu en el canvi d'eicosanoids sintetitzats, possiblement durant la resolució de la inflamació, i poden tenir un impacte més important disminuint la inflamació causada pels leucòcits en el dany hepàtic agut.

Les LXs també estan involucrades en la regulació de factors de transcripció implicats en el control de la inflamació i el dany hepàtic. Un grup d'aquests reguladors transcripcionals és la família dels PPARs els quals regulen gens implicats en inflamació, proliferació cel·lular, apoptosi i diferenciació [319]. En el primer estudi a més de demostrar que aquest compost antiinflamatori disminuïa l'activitat de la 5-LO en macròfags (a una extensió similar a la PGE₂), es va veure que la 15-epi-LXA₄ inhibia significativament els nivells de PPAR α , un efecte que també es va observar quan aquestes cèl·lules parenquimals s'exposaven a ASA. A més les 15-epi-LXs, a part de modular l'expressió de factors transcripcionals, també van disminuir significativament la secreció de CINC-1 (l'homòleg en rata de la interleuquina 8 humana) en els hepatòcits adjacents. Així doncs, la 15-epi-LXA₄ a més de modular l'expressió de factors transcripcionals clau, també regula els nivells de citoquina-quimioquina. Vam observar en hepatòcits que la 15-epi-LXA₄ produïa una disminució de CINC-1. Pel contrari, el LTB₄ en combinació amb la PGE₂ generada en les KCs va estimular la producció de CINC-1 en els hepatòcits adjacents.

Ja que els productes derivats de l'AA conjuntament amb els reguladors de transcripció gènica (p. ex. PPAR α) i els seus gens diana (p. ex. CINC-1) juguen un paper central en el control de la inflamació, els nostres resultats proporcionen una contribució important en l'estudi dels mecanismes d'acció d'un dels AINEs més àmpliament utilitzats: l'ASA.

Malauradament, s'ha vist que l'administració d'AINEs a pacients amb cirrosi descompensada està associada freqüentment a una fallada renal aguda. Aquestes evidències es van observar amb l'administració d'indometacina, ibuprofè i lisina-acetilsalicilada a pacients amb malaltia hepàtica alcohòlica, malaltia hepàtica crònica i cirrosi [320-322]. Aquest efecte va ser també observat amb l'administració d'altres compostos com el naproxè i el sulindac [323-325]. Altres investigacions més detallades van demostrar que el dany en l'índex de filtració glomerular (GFR) estava relacionat amb una reducció de la perfusió renal, secundària a la inhibició de la producció renal de PGs vasodilatadores [326,327]. Per tant, s'arriba a la conclusió que els AINEs s'han d'utilitzar amb molta precaució en pacients amb cirrosi o ascites.

Diversos estudis en humans han observat nivells incrementats de COX-2 en pacients amb hepatitis crònica i cirrosi hepàtica [245-247]. Aquests resultats són consistents amb el nostre segon estudi on es dona evidència de l'existència d'una marcada expressió de COX-2 en fetges de rates tractades amb CCl₄.

Evidències recents apunten a les KCs són el tipus cel·lular principal responsable de l'increment de COX-2 en el fetge. De fet, aquests macròfags residents del fetge són els únics que es posicionen com les cèl·lules inflamatòries efectores predominants en aquest òrgan, disposen de l'expressió de COX-2 i tenen la principal capacitat hepàtica de produir mediadors lipídics derivats de l'AA [39,165,177,249,328]. No obstant, no es pot descartar completament la contribució d'altres cèl·lules hepàtiques no parenquimals en la sobre-expressió de COX-2 en fetges tractats amb CCl₄. Per exemple, les HSCs mostren expressió de COX-2 en cultiu, la qual és induïda durant la transició cap al fenotip activat i després de l'estimulació amb TNF α , IL-1 α o TGF- β 1 [153,155].

Afortunadament durant els últims anys s'han desenvolupat una nova generació de compostos antiinflamatoris per ús clínic els quals s'han vist que inhibeixen selectivament l'activitat de la COX-2 *in vitro* i són tant efectius com els AINEs convencionals en un gran nombre de models d'inflamació *in vivo* [119,120,329] però presenten menys incidència d'efectes adversos renals i gastrointestinals [330,331].

Actualment els inhibidors selectius de la COX-2 o coxibs són de gran interès perquè representen una opció terapèutica alternativa al tractament de la inflamació en malalties com la cirrosi amb acites en les quals la funció renal és críticament dependent de PGs. De fet, estudis en cirrosi experimental han demostrat que la funció renal es veu afectada per AINEs i inhibidors de COX-1 però no per inhibidors selectius de COX-2 com p. ex. el SC-236 i el celecoxib [330,331]. En un estudi recent realitzat en pacients amb cirrosi i ascites sense síndrome hepatorenal s'ha vist que l'administració a curt termini de l'inhibidor selectiu de COX-2 celecoxib, pot ser més segura que l'administració d'AINEs, com el naproxè, ja que el celecoxib no afectaria a la funció renal i plaquetària en resposta als diurètics [332].

Pel que fa al segon estudi presentat vam observar que el SC-236 actuava com a inhibidor del creixement i presentava activitat pro-apoptòtica en HSCs i en KCs. Aquestes accions ja s'havien observat amb altres tipus cel·lulars exposats a SC-236 o celecoxib [71,333]. La identificació del SC-236 com un estímul apoptòtic per les cèl·lules no parenquimals pot tenir implicacions patofisiològiques. Ja que la proliferació i l'apoptosi de les HSCs és un element clau en la regulació de la progressió de la fibrosi hepàtica, diverses estratègies basades en la inhibició de la proliferació i la inducció a l'apoptosi de les HSCs s'han considerat com a propostes antifibròtiques potencials [189,254,255]. Per altra banda, les KCs són conegudes per la seva participació en la inflamació hepàtica i promouen l'activació de les HSCs a través de l'alliberament de factors paracrins [136,184,191,254]. Per tant, la presència d'un número elevat de KCs activades es considera crític en la iniciació de la cascada inflamatòria que desencadena la fibrosi hepàtica [38,165,192]. Fent referència al paper que juguen els macròfags en la inflamació hepàtica, la seva eliminació selectiva durant la progressió del dany o la reducció de la seva supervivència per inhibició de la via de la 5-LO està associada amb un efecte antifibròtic considerable [165,190].

Els resultats del segon treball van confirmar que la inhibició de la supervivència de les KCs pel SC-236 també contribuïa a la disminució de la fibrogènesi hepàtica. El mecanisme pel qual el SC-236 indueix apoptosi no està ben definit, tot i que s'han suggerit diversos mecanismes

moleculars com les vies dependents de COX-2 (modulació de la biosíntesi de PGs [334]) i les vies independents de COX-2 (regulació de l'activador de proteïna-1 [335], inhibició de la fosforilació de la proteïna quinasa B serina/treonina (Akt) [336] o la disminució de l'expressió de la proteïna C quinasa [333]).

Així doncs, el mecanisme pel qual l'inhibidor selectiu de la COX-2, SC-236, pot inhibir la fibrosi hepàtica no està del tot descrit. En el nostre treball s'apunta cap a la possibilitat que el SC-236 actuï a través del receptor nuclear PPAR γ . En aquest segon treball, es va observar que el SC-236 incrementava l'expressió del PPAR γ en HSCs i recuperava la seva expressió a nivells normals en fetges de rates tractades amb CCl₄.

El PPAR γ 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]. Estudis realitzats *in vitro* amb HSCs han demostrat que els lligants del PPAR γ recuperen l'expressió d'aquest receptor nuclear i reverteixen les HSCs activades a un fenotip quiescent [254,267,268]. De la mateixa manera s'ha vist en estudis *in vivo* que l'administració de lligants sintètics del PPAR γ (p. ex. les TZDs) a models animals de fibrosi hepàtica redueixen la transdiferenciació de les HSCs i la deposició de col·lagen [266]. Cal afegir que els resultats obtinguts en el nostre assaig reporter de transactivació van ser indicatius que el SC-236 a més de recuperar l'expressió del PPAR γ també actuava com a lligant d'aquest receptor nuclear. Aquest efecte va ser comparable amb la inducció exercida pel lligant natural i activador del PPAR γ , la 15d-PGJ₂. Aquesta propietat no només és exclusiva del SC-236 sinó que altres inhibidors selectius de COX-2 relacionats estructuralment exerceixen accions semblants [337]. Aquests resultats juntament amb l'observació que els efectes antiproliferatius del SC-236 eren similars a aquells exercits pel lligant del PPAR γ rosiglitazone, donen suport al concepte que les propietats antifibròtiques del SC-236 estan mitjançades, almenys en part, per l'activació del PPAR γ .