
**HEPATITIS ALCOHÓLICA:
ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA E IDENTIFICACIÓN DE
MECANISMOS PATOGENICOS**

Marlene Domínguez García

Barcelona 2009



FACULTAT DE MEDICINA

**HEPATITIS ALCOHÓLICA:
ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA E IDENTIFICACIÓN DE
MECANISMOS PATOGENÉTICOS**

Memoria presentada por

Marlene Domínguez García

para optar al título de Doctora en Medicina

Trabajo realizado bajo la dirección de los Dres. Ramón Bataller Alberola y Juan Caballería Rovira del Servicio de Hepatología del Hospital Clínic de Barcelona

Marlene Domínguez García

Dr. Ramón Bataller Alberola

Director

Dr. Juan Caballería Rovira

Director

Dr. Pere Ginès Gibert

Tutor

Tesis inscrita en el programa de doctorado de Biopatología en Medicina.

Departamento de Medicina, bienio 2005-2007.

*A mi madre, mi padre,
mis hermanos,
mis sobrinos y
a mi hermana la peque.*

*Ningún número de experimentos, por muchos que sean,
podrán demostrar que tenga razón.
Tan solo un experimento puede demostrar que estoy equivocado.*

*Una mente que ha sido estirada por nuevas ideas,
nunca podrá recobrar su forma original.*

Albert Einstein

Esta sección ha sido una de las más difíciles de escribir por su alto contenido emocional y porque durante la redacción de la misma vienen a mi memoria muchos momentos vividos a lo largo de estos años que nublan mis ojos. Inicialmente pensé en no incluir esta sección en la tesis. Sin embargo, después de reflexionarlo, me parece injusto para aquellas personas que sin su ayuda y colaboración esta tesis no sería posible, ya que los estudios realizados son el producto del trabajo en equipo de un grupo de personas maravillosas que han permitido que este proyecto llegue a su fin. El orden en que han sido escritos los agradecimientos no es ni mucho menos en orden de importancia, sencillamente es la forma en que vienen a mi memoria.

A mi familia al otro lado del océano, mis padres, hermanos, la peque y mis sobrinos, los cuales me han dado su apoyo incondicional y la fortaleza para permanecer al pie del cañón, incluso en los momentos de debilidad y de flaqueza, sin su ayuda hubiese sido imposible estar aquí. *Con especial mención a mi madre a quien le debo todo lo que soy.* A Karen por su ayuda en el diseño de la portada de esta tesis y por el cariño que me ha demostrado desde que nos conocemos. A mis amigos en Venezuela y Barcelona por estar allí cada día, independientemente de las circunstancias.

A mis directores de tesis por su valiosa ayuda en estos años de doctorado. A Ramón por mostrarme el fascinante *mundo de la investigación* y darme la oportunidad de descubrir que tengo aptitudes para él, por enseñarme el arte de escribir *papers* y por demostrarme que en investigación se requiere una alta dosis de *paciencia y de perseverancia*. A Joan Caballería por el apoyo que me ha dado para la realización de los estudios que componen esta tesis y por saber estar allí cada vez que lo necesité.

A mis compañeros de laboratorio que con su granito de arena han permitido crear esta montaña llamada tesis. Gracias por ser mi *familia catalana* durante estos

años de doctorado; la amistad y el cariño que me han ofrecido permanecerán eternamente en mi corazón y mis recuerdos. A Cristina Millán por ser una persona especial y auténtica, por ayudarme con las “*inmunos*”, por la paciencia para hacer miles de pruebas hasta encontrar las mejores condiciones y las mejores fotos, pero sobretodo gracias por la amistad brindada durante estos años y por escucharme pacientemente en mis momentos de dudas y a veces casi de desesperación. A Elena Juez por ser una persona clave en el laboratorio 503, por ayudarme con las PCR, con la extracción de RNA, recogida y procesamiento de muestras, entre muchas otras cosas, pero fundamentalmente por ser *amiga* incondicional. A Montse Moreno, por estar ahí cada vez que la necesité, por responder mis dudas y escucharme siempre con una sonrisa. A Raquel Cela, por sus consejos y comentarios siempre muy acertados y útiles, por darme sus puntos de vista y por recibir los míos de buen agrado y principalmente por la amistad y el cariño que me ha dado durante estos años. A Jordi Colmenero por la ayuda con la base de datos, por las excelentes ideas que mejoraron los *papers* y también por sus chistes y comentarios divertidos que ayudaron a alegrar muchos momentos compartidos.

Gracias también a todas aquellas personas que directa o indirectamente hayan participado en los estudios y en esta tesis aunque sea con una sonrisa amable en el momento oportuno y que al leer esta tesis se den por aludidos. Pido disculpas a todas las personas que me han ayudado durante estos 4 años, pero que debido a mi memoria imperfecta no he mencionado en estas páginas.

Moltes gràcies a tots

ABREVIATURAS

- ADH: Alcohol dehidrogenasa
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ALDH: Acetaldehído dehidrogenasa
- ALT: Alanino aminotransferasa
- AST: Aspartato aminotransferasa
- BCL2: Célula beta 2 de linfoma
- CHC: Carcinoma hepatocelular
- CXCR: Receptor de quimiocinas CXC
- CYP2E1: Citocromo P450 2E1.
- E: Especificidad
- EHA: Enfermedad hepática alcohólica
- ENA-78: Proteína epitelial activadora de neutrófilos
- FD de Maddrey: Función Discriminante de Maddrey
- GAHS: Índice de Hepatitis Alcohólica de Glasgow
- GCP-2: Proteína 2 quimiotáctica de granulocitos
- GGT: Gamma glutamil transpeptidasa
- γ IP10: Proteína inducida por interferón gamma
- GPVH: Gradiente de presión venosa hepática
- Gro: Factor estimulador de crecimiento de melanoma
- GSH: Glutation
- HA: Hepatitis alcohólica
- H&E: Hematoxilina y eosina
- ICAM: Molécula de adhesión intercelular
- IFN- γ : Interferón gamma
- IL: Interleucina
- INR: Razón normalizada internacional
-

LPS: Lipopolisacárido

MAPKs: Proteína quinasa mitógeno activada

MCP-1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos

MELD: Modelo de enfermedad hepática de estadio final

mGSH: Glutathion mitocondrial

MIP-1 α : Proteína 1 α inflamatoria de macrófagos

MnSOD: Manganeso superóxido dismutasa

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida adenina

NADH: Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NF κ B: Factor nuclear kappa de células B activadas

PF4: Factor plaquetario 4

PIIINP: Péptido N-terminal de procolágeno tipo III

PPBP: Interferón básico proplaquetario

RE: Retículo endoplásmico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RR: Riesgo relativo

S: Sensibilidad

SAMe: S-adenosilmetionina

SREBP: Proteínas de unión de elementos reguladores de esteroides

STAT 1: Factor 1 activador de transcripción y transductor de señal

TGF β : Factor transformante de crecimiento beta

Th1: Células T ayudadoras tipo 1.

Th2: Células T ayudadoras tipo 2

TIPS: Cortocircuito transyugular portosistémico intrahepático

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alpha

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral

TOH: Trasplante hepático ortotópico

VCAM: Molécula de adhesión celular vascular

VCM: Volumen corpuscular medio

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA	
1.1.1 Concepto y causa	1
1.1.2 Historia Natural	4
1.1.3 Patogenia	7
1.1.4 Diagnóstico	14
1.1.5 Tratamiento	17
1.2 HEPATITIS ALCOHÓLICA	
1.2.1. Concepto	20
1.2.2. Patogenia	20
1.2.3. Historia natural	28
1.2.4. Diagnóstico	29
1.2.5. Hallazgos histológicos	30
1.2.6. Evaluación pronóstica	33
1.2.7. Tratamiento	40
2. JUSTIFICACIÓN	53
3. OBJETIVOS	57
4. RESULTADOS	
4.1. Estudio 1: Un Nuevo Sistema de Puntuación para la Estratificación Pronóstica de los pacientes con Hepatitis Alcohólica.	61

4.2. Estudio 2: La Expresión Hepática de Quimiocinas CXC Predice la Supervivencia y la Hipertensión Portal en Pacientes con Hepatitis Alcohólica.	77
5. DISCUSIÓN	115
6. CONCLUSIONES	127
7. BIBLIOGRAFIA	133

Índice de Tablas

Tabla 1. Riesgo relativo de desarrollar enfermedad hepática alcohólica según la ingesta de alcohol.	2
Tabla 2. Criterios diagnósticos de abuso y dependencia de alcohol según el DSM-IV.	3
Tabla 3. Quimiocinas CXC y sus receptores.	26
Tabla 4. Clasificación de Child-Pugh-Turcotte.	34
Tabla 5. Fórmulas para el cálculo de los diferentes índices predictivos de mortalidad en paciente con HA.	37
Tabla 6. Índices predictivos de mortalidad en HA.	38

Índice de Figuras

Figura 1. Progresión de la enfermedad hepática alcohólica en pacientes con abuso de alcohol.	5
Figura 2. Metabolismo del alcohol en el hepatocito.	8
Figura 3. Respuesta del hepatocito al TNF- α .	13
Figura 4. Algoritmo de despistaje y diagnóstico de la enfermedad hepática alcohólica.	15

Figura 5. Patogenia de la Hepatitis Alcohólica.	21
Figura 6. Funciones biológicas de las quimiocinas y sus receptores.	25
Figura 7: Correlación de la expresión génica hepática de Gro- α en pacientes con hepatitis alcohólica.	27
Figura 8: Corte histológico de hepatitis alcohólica.	31
Figura 9. Curva de Kaplan-Meier mostrando supervivencia a los 28 días en pacientes con hepatitis alcohólica.	35
Figura 10. Análisis del área bajo la curva del gradiente de presión venosa hepática (GPVH) en pacientes con hepatitis alcohólica grave.	39
Figura 11: Curva de Kaplan-Meier según el modelo de Lille.	43



Barcelona, 2006

INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA

1.1.1 Concepto y Causa

La enfermedad hepática alcohólica (EHA) es una entidad clínico patológica ocasionada por el consumo abusivo de alcohol, que incluye la esteatosis hepática simple, la esteatohepatitis, la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular (CHC) [1, 2]. Estas entidades pueden superponerse y es difícil encontrarlas en su forma histopatológica pura [3]. La EHA es una de las mayores complicaciones médicas asociadas al abuso de alcohol y es una de las principales causas de enfermedad hepática en el mundo occidental [1, 4].

La supervivencia de los pacientes con cirrosis alcohólica es peor que la de los cirróticos de otras etiologías, con una tasa de supervivencia a los 5 años que oscila entre el 23 y el 50% [5]. De hecho, aproximadamente, el 44% de los pacientes que fallecen por cirrosis hepática y sus complicaciones padecen una cirrosis de origen alcohólico. La EHA constituye un problema de salud pública en el mundo occidental debido a la elevada prevalencia del consumo de alcohol. El 20 a 30% de la población de Europa y USA, consume cantidades excesivas de alcohol [6]. Además, en los últimos años ha incrementado el consumo de alcohol con una tendencia a la ingesta abusiva, principalmente en países desarrollados.

El grado de ingesta de alcohol necesario para desarrollar una enfermedad hepática es controvertido. Una ingesta diaria de alcohol de aproximadamente 30 gr/día incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad hepática. Sin embargo, las mujeres tienen mayor susceptibilidad al alcohol y el umbral es de 20 gr/día [4]. Esta mayor susceptibilidad puede deberse a causas farmacocinéticas, tales como diferencias en la

absorción de etanol y a una peor respuesta hepática al estrés oxidativo producido por el alcohol. Además de la cantidad de alcohol, el patrón de ingesta alcohólica también es importante. Existen diferencias entre personas que consumen alcohol en asociación con las comidas y en las que ingieren múltiples tipos de bebidas alcohólicas. La ingesta de alimentos retrasa el vaciamiento gástrico y enlentece la absorción intestinal del alcohol, de manera que la concentración sérica de etanol es menor si se asocia con la ingesta alimentaria. El consumo de bebidas con menor grado alcohólico también se asocia a una menor concentración sérica de etanol [4, 7]. En la tabla 1 se muestra el riesgo relativo (RR) de desarrollar EHA de acuerdo a la ingesta alcohólica en relación con el sexo.

Tabla 1: Riesgo relativo de desarrollar enfermedad hepática alcohólica según la ingesta de alcohol.

Unidades/semana de ingesta alcohólica	Cirrosis alcohólica		Enfermedad hepática alcohólica	
	Hombres (RR)	Mujeres (RR)	Hombres (RR)	Mujeres (RR)
<1	3,7	1,09	1,8	1
1 a 6	1	1	1	1
7 a 13	0,9	4,1*	1,1	2,9*
14 a 27	1,6	3,1*	1,4	2,9*
28 a 41	7*	16,8*	3,8*	7,3*
42 a 69	13*	NR	5,9*	NR
≥ 70	18,1*	NR	9,1*	NR

Unidades representan 10-12 gr de alcohol (una cerveza, una copa de vino, un trago de bebida espirituosa). * $p < 0.05$. NR=no reportado. RR= riesgo relativo. Extraído de Menon et al. [8].

Existen 2 tipos de trastornos asociados con el consumo crónico de alcohol según el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV) de la Asociación Americana de Psiquiatría: el abuso y la dependencia de alcohol. Ambas se caracterizan por la presencia de un patrón desadaptativo de consumo alcohólico que lleva a un malestar o deterioro clínicamente significativos [9]. En la tabla 2 se describen los criterios diagnósticos para cada grupo.

Tabla 2: Criterios diagnósticos de abuso y dependencia de alcohol según el DSM-IV.

ABUSO DE ALCOHOL

Presencia de uno o más de los siguientes criterios durante un periodo de 12 meses:

- Consumo recurrente de alcohol que da lugar al incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o en casa (p. ej., ausencias repetidas o pobre rendimiento laboral relacionados con el consumo de alcohol; ausencias relacionada con el alcohol, suspensiones o expulsiones de la escuela; descuido de los niños o de las obligaciones del hogar).
- Consumo recurrente de alcohol en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso (p. ej., conducir un automóvil o accionar una máquina bajo los efectos del alcohol).
- Problemas legales repetidos relacionados con el alcohol (p. ej., arrestos por comportamiento escandaloso debido al alcohol).
- Consumo continuado de alcohol a pesar de tener problemas sociales continuos o recurrentes o problemas interpersonales causados o exacerbados por los efectos del alcohol (p. ej., discusiones con la pareja acerca de las consecuencias de la intoxicación o violencia física).

DEPENDENCIA DE ALCOHOL

Presencia de 3 ó más de los siguientes criterios por un periodo de 12 meses:

- Tolerancia definida por cualquiera de los siguientes: a) Necesidad de cantidades marcadamente crecientes de alcohol para conseguir la intoxicación o el efecto deseado. b) Efecto marcadamente disminuido con el consumo continuado de las mismas cantidades de alcohol.
 - Abstinencia definida por cualquiera de los siguientes: a) El síndrome de abstinencia característico para el alcohol (ver DSM-IV para más detalles). b) El alcohol es ingerido para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.
 - El alcohol es frecuentemente ingerido en cantidades mayores o durante un período más prolongado de lo que inicialmente se pretendía.
 - Existe deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de alcohol.
 - Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención del alcohol, en el consumo del alcohol o en la recuperación de los efectos del mismo.
 - Reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo de alcohol.
 - Se continúa ingiriendo alcohol a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes, que son causados o exacerbados por el consumo de alcohol.
-

1.1.2 Historia Natural

El espectro clínico de la EHA comprende 3 formas: la esteatosis simple, la hepatitis alcohólica (HA) y la cirrosis alcohólica [4]. La esteatosis hepática puede desarrollarse en casi la totalidad de los pacientes con consumo elevado y prolongado de alcohol. Sin embargo, de estos pacientes, sólo el 10 a 35% desarrollarán HA y el 8 a 20% desarrollarán cirrosis alcohólica. Probablemente el alcohol actúe como una sustancia hepatotóxica que asociado a otros factores del huésped y a factores externos (sexo, polimorfismos de enzimas metabolizadoras del alcohol, factores inmunológicos, exposición a otras sustancias/drogas, infecciones virales hepáticas, deficiencias nutricionales y obesidad, entre otras) puedan llevar al desarrollo de enfermedad hepática [5, 10]. En la figura 1 se muestra la historia natural de la EHA.

La esteatosis hepática ocurre casi invariablemente en pacientes con una ingesta diaria de alcohol > 60 gr. Histológicamente se caracteriza por la ocupación citoplasmática de gran parte de los hepatocitos por triglicéridos. Clínicamente, los pacientes son asintomáticos y suelen tener función hepática normal. Esta condición es reversible tras la abstinencia alcohólica sostenida, pero puede progresar a cirrosis hepática si persiste la ingesta alcohólica acentuada [4, 8]. Existen algunos datos que sugieren que la esteatosis simple puede evolucionar a cirrosis. Aproximadamente, el 18% de los pacientes con hígado graso pueden progresar a fibrosis y el 10% a cirrosis hepática si persiste la ingesta alcohólica [6]. La cirrosis es la forma más avanzada de la enfermedad y puede coexistir con la presencia de esteatohepatitis. Generalmente ocurre con la ingesta elevada y prolongada de alcohol, 40-80 gr/d en hombres y 20-40 gr/d en mujeres, durante 10-12 años [4]. El pronóstico de los pacientes con cirrosis hepática mejora con la abstinencia alcohólica. La supervivencia a los 5 años de pacientes con cirrosis compensada tras la abstinencia es del 90%, pero disminuye a menos del 70% en

pacientes que continúan bebiendo. Por otro lado, en pacientes con cirrosis descompensada, la tasa de supervivencia a 5 años es de 60% si se mantienen abstinentes, pero cae a < 30% en pacientes que continúan con la ingesta alcohólica [6].

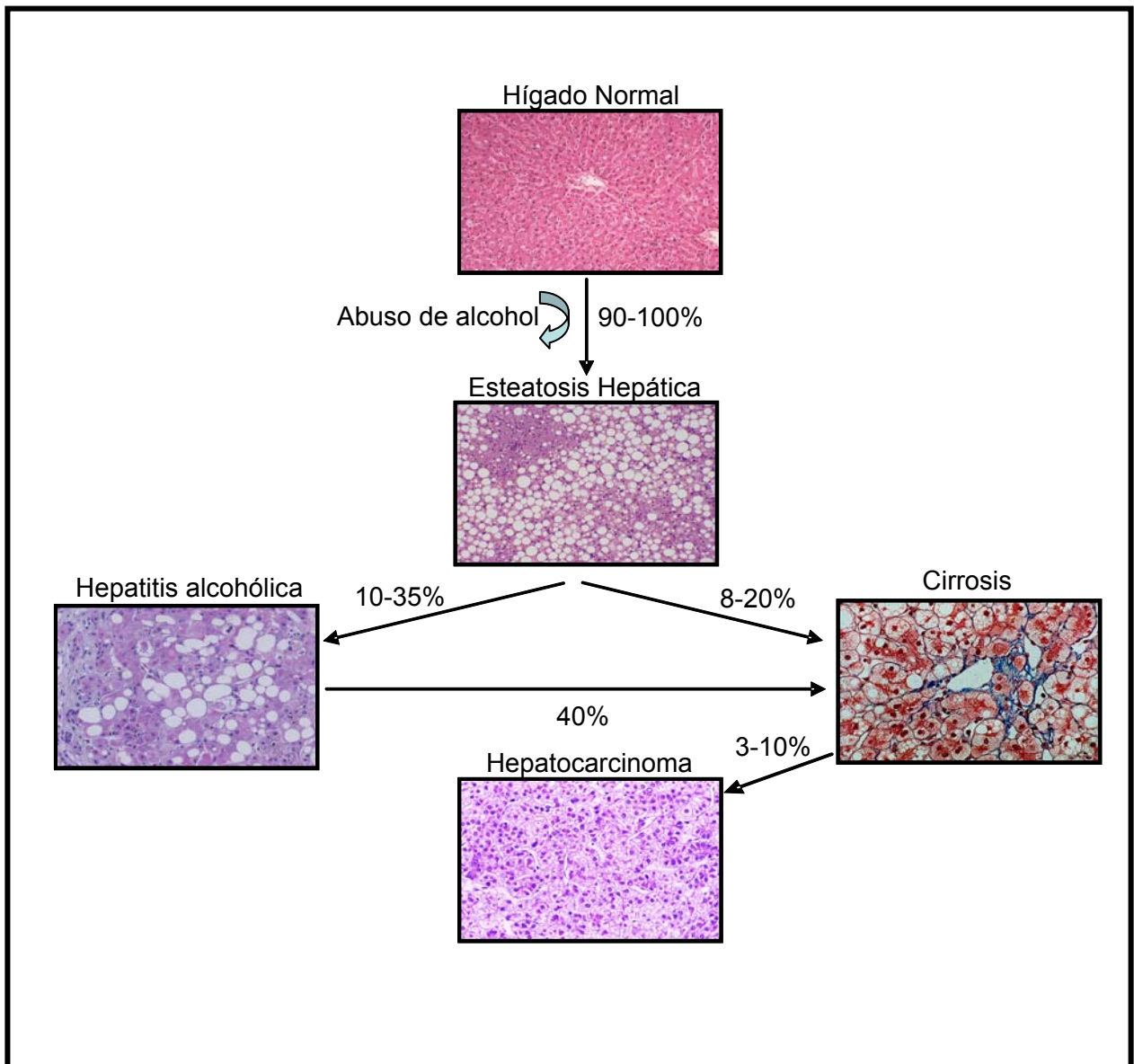


Figura 1. Progresión de la enfermedad hepática alcohólica en pacientes con abuso de alcohol. Modificado de McCullough et al. [5].

El alcohol puede considerarse tanto una causa primaria como un cofactor para el desarrollo de CHC. Estudios longitudinales y de casos-controles han demostrado una asociación entre el consumo crónico de alcohol y el CHC [6]. El riesgo de desarrollar CHC incrementa con un consumo de alcohol > 60 gr/d durante más de 10 años. Pacientes con cirrosis descompensada tienen un riesgo de 1%/año de desarrollar CHC. Este riesgo incrementa significativamente en pacientes que ingieren alcohol y tienen infección por virus de hepatitis C (VHC) y/o virus de la hepatitis B [6].

Otras enfermedades hepáticas influyen el pronóstico de pacientes con EHA, principalmente la hepatitis crónica C. Aproximadamente el 35-40% de los pacientes con abuso crónico de alcohol tienen infección por VHC. En estos pacientes la enfermedad hepática es más avanzada. La infección crónica por VHC y el alcohol constituyen el 70 a 90% de todos los casos de enfermedad hepática crónica en el mundo occidental. El 20 % de los alcohólicos crónicos que tienen infección por VHC pueden desarrollar cirrosis en un período de 20-30 años y una parte de estos pacientes desarrollarán CHC. Se ha demostrado que el alcohol incrementa la progresión de la fibrosis y el riesgo de desarrollar CHC en pacientes con hepatitis crónica C. Asimismo, en pacientes que tienen coinfección por VHC y VIH, el alcohol también acelera la progresión de la fibrosis hepática [11]. Existen estudios que han evaluado el impacto del uso y abuso de alcohol sobre la hepatitis crónica B obteniendo resultados controvertidos en relación con enfermedad más avanzada [12, 13].

1.1.3. Patogenia

La patogenia y los mecanismos fisiopatológicos implicados en la EHA no son del todo conocidos y la mayoría de los conocimientos provienen de estudios experimentales. Actualmente, los modelos animales representan una herramienta clave para la investigación, ya que permiten usar métodos que no pueden ser usados en humanos, como la manipulación génica. Sin embargo, los resultados obtenidos en modelos experimentales de daño hepático inducido por alcohol no siempre pueden trasladarse al ser humano y existe una clara necesidad de nuevos modelos que reproduzcan la condición humana, debido a la inexistencia de un modelo animal ideal de EHA [14].

Estudios en diversos modelos experimentales han demostrado que una dosis única de alcohol ejerce efectos nocivos sobre la función hepática [14]. El metabolismo del etanol ocurre principalmente en el hígado, lo que puede explicar la toxicidad del alcohol sobre este órgano [4]. En el hígado hay tres sistemas enzimáticos que participan en el metabolismo del etanol: la alcohol dehidrogenasa (ADH), el sistema citocromo P450 (predominantemente CYP2E1) y las catalasas [10, 15] (Figura 2). Estas tres vías producen acetaldehído y sus productos. La oxidación del alcohol por la ADH es acompañado de la reducción del dinucleótido de adenina nicotinamida oxidado (NAD⁺) a dinucleótido de adenina nicotinamida reducido (NADH), generando un ambiente reducido en el citosol de los hepatocitos. Debido a que la mitocondria no es permeable al NADH, la lanzadera de malato-aspartasa transfiere los equivalentes reducidos de NADH citosólico a la mitocondria [15]. El acetaldehído es subsiguientemente oxidado a acetato por la acetaldehído dehidrogenasa (ALDH) principalmente en la mitocondria de hepatocitos localizados en la zona 3 hepática. Esta reacción es lenta y en pacientes con una elevada ingesta alcohólica hay acumulación de acetaldehído [4, 10].

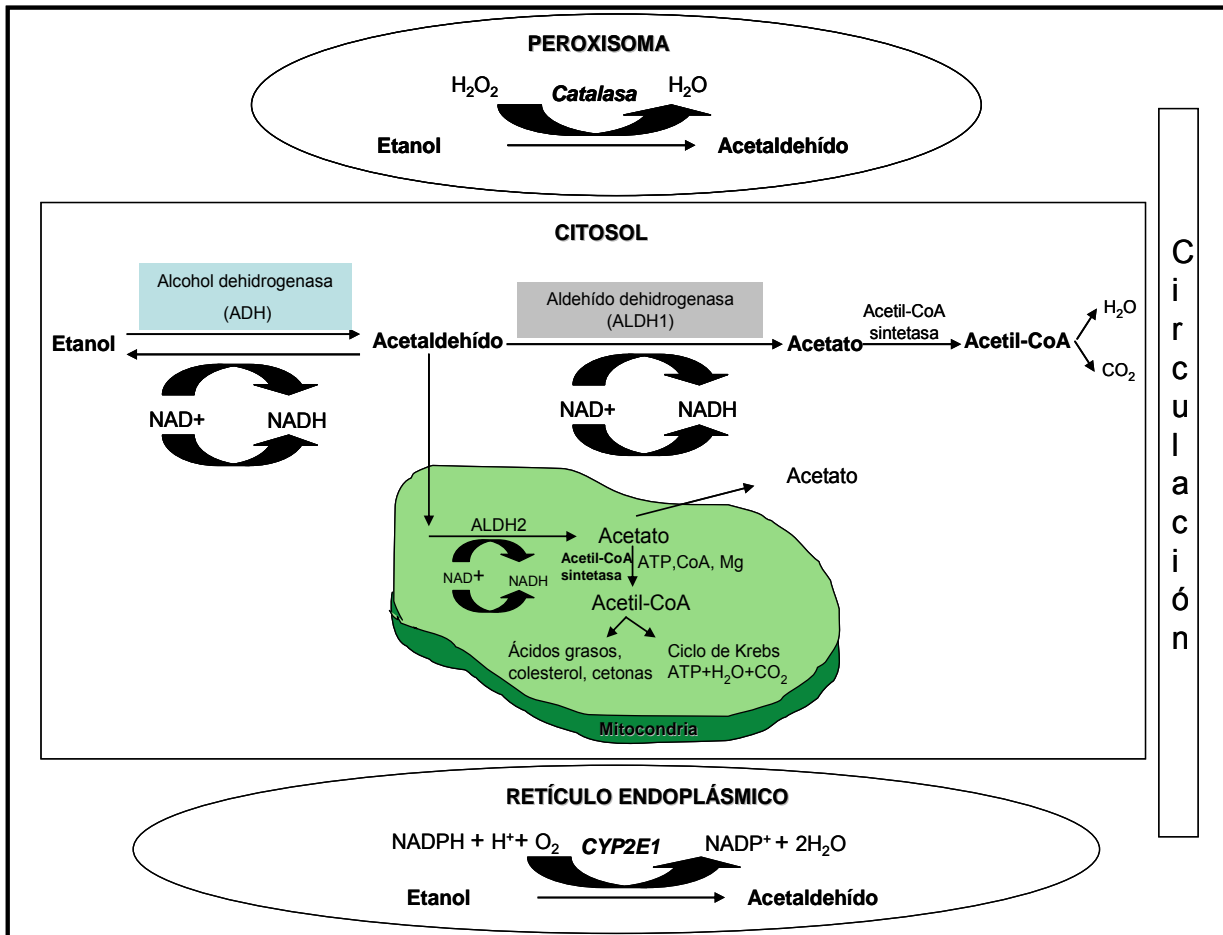


Figura 2: Metabolismo del alcohol en el hepatocito.

En el hígado, el acetaldehído puede unirse covalentemente a proteínas y a pequeñas moléculas como la cisteína, que lleva a interferencia en diferentes procesos biológicos. Estos cambios pueden estimular la respuesta inflamatoria humoral y celular del huésped llevando a la producción de autoanticuerpos [4, 10]. Además del acetaldehído, otros metabolitos del alcohol también se unen covalentemente con proteínas formando aductos que interfieren con la función proteica, específicamente si hay un residuo de lisina en el sitio de unión funcional de la proteína. Esta adición altera el metabolismo proteico y la función celular produciendo proteínas inmunoreactivas que actúan como verdaderos inmunógenos estimulando la producción local de anticuerpos y la activación de células T que reaccionan contra las proteínas aductos, que son aclaradas

rápidamente por el sistema retículo-endotelial. Sin embargo, ante la exposición repetida al alcohol, estas proteínas aductos se forman nuevamente y estimulan el sistema inmune ocasionando un daño hepático mayor. Este proceso es cada vez más acentuado con la exposición repetida al alcohol hasta que el daño hepático se hace irreversible [16].

Las isoenzimas del sistema de citocromo P450, predominantemente localizadas en el retículo endoplásmico, también contribuyen a la oxidación del alcohol en el hígado. La CYP2E1 es inducida por el consumo crónico de alcohol y tiene un papel importante en el metabolismo del etanol a acetaldehído en presencia de concentraciones elevadas de alcohol [15]. La CYP2E1, además de catalizar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que lleva a estrés oxidativo, interviene también en la peroxidación lipídica de las membranas microsomales [17]. El metabolismo del alcohol puede entonces causar EHA a través de la formación de acetaldehído, producción de ROS y alteración del estado redox del hepatocito. El incremento del NADH mitocondrial en los hepatocitos debido al metabolismo del acetaldehído contribuye a la saturación de la NADH dehidrogenasa [15]. En modelos animales se ha encontrado que inhibidores de CYP2E1 bloquean parcialmente el daño hepático inducido por el etanol. Sin embargo, el mecanismo responsable es desconocido. Se cree que la CYP2E1 se acopla a la citocromo reductasa, llevando a la producción de anión superóxido y a la peroxidación lipídica [10, 17]. La inducción de la actividad de la ADH y de la CYP2E1 produce un incremento del consumo de oxígeno en el hígado que lleva a hipoxia centrolobulillar [17, 18]. La hipoxia promueve el estrés oxidativo a través de la liberación de hierro y depleción de S-adenosilmetionina (SAM). Esta depleción causa una reducción en la síntesis de glutatión (GSH) y puede empeorar el transporte de GSH a la mitocondria, ocasionando una disminución selectiva del depósito mitocondrial de GSH. Además, la depleción de SAM también promueve la expresión de citocinas proinflamatorias y citotóxicas en los macrófagos hepáticos por un mecanismo dependiente de NF- κ B (Factor nuclear- κ B), un

potente mecanismo inflamatorio [17]. Los bajos niveles intrahepáticos de SAM ocurren por disminución de la actividad de la metionina adenosiltransferasa, mientras que la homocisteína se acumula por la inhibición de la síntesis de metionina a partir de homocisteína. Altos niveles de homocisteína, acetaldehído y estrés oxidativo ocasionan un incremento en la respuesta de proteínas del retículo endoplásmico (RE), denominado estrés del RE. El estrés del RE puede activar proteínas de unión de elementos reguladores de esteroides (SREBP) 1c y 2, las cuales contribuyen a la acumulación de triglicéridos y colesterol, respectivamente. Los primeros llevan a hígado graso y el segundo puede llevar a enriquecimiento del colesterol libre en la mitocondria, resultando en una reducción de la captación mitocondrial de GSH, con subsiguiente depleción de este importante antioxidante en la mitocondria. Este defecto representa el mecanismo crucial de sensibilización del hepatocito a la muerte celular mediado por estrés oxidativo inducido por moléculas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) [18, 19]. Este defecto ocurre principalmente en la mitocondria de hepatocitos perivenulares teniendo potencial significado en contribuir a las manifestaciones iniciales de la injuria hepatocelular inducida por etanol. Es probable que los hepatocitos perivenulares puedan ser particularmente susceptibles a los efectos tóxicos del TNF debido a la deficiencia del depósito mitocondrial de GSH por la exposición crónica al alcohol [19].

Otro mecanismo patogénico es debido al efecto del alcohol sobre el aumento de la permeabilidad intestinal a las endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS) presentes en la pared de bacterias Gram-negativas. Estas endotoxinas alcanzan la circulación portal y sistémica [12]. Las endotoxinas circulantes se unen a proteínas de unión de LPS y este complejo se une al receptor CD14 en la superficie de las células de Kupffer en el hígado. El complejo LPS-CD14 interacciona con receptores transmembrana *Toll-like receptor 4* (TLR4) que traduce señales al citoplasma y ocasiona la activación del factor de transcripción NF- κ B. Este factor de transcripción se une a elementos del núcleo que llevan al incremento de la

regulación de genes de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α [12, 20-22]. El TNF- α al unirse a sus receptores desencadena una cascada de señales intracelulares que involucra la activación del factor de transcripción NF- κ B y quinasas de proteínas (MAPKs), ocasionando la producción de citocinas pro-inflamatorias (interleucina 1 beta - IL-1 β -, IL-6 e IL-8). En la EHA además del incremento de la expresión de estas citocinas pro-inflamatorias también ocurre una disminución de la expresión de citocinas anti-inflamatorias como la IL-4. Las citocinas pro-inflamatorias estimulan las células estrelladas hepáticas (CEH), que son las principales productoras de colágeno, conduciendo al desarrollo de fibrosis hepática [4]. Las CEH activadas presentan un fenotipo similar a los miofibroblastos presentando propiedades fibrogénicas contráctiles e inflamatorias. En la fibrogénesis experimental y humana, existe un acúmulo de CEH activadas que precede al depósito de colágeno. Estas células pueden ser activadas por la esteatosis, la necrosis y la inflamación hepática. Cuando la causa del daño hepático es eliminada, en ocasiones la fibrosis puede revertir. En este proceso existe una degradación del colágeno por las metaloproteinasas y una desaparición de las CEH activadas por medio de la apoptosis. Las principales citocinas pro-fibrogénicas para las CEH son el factor transformante de crecimiento β (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la angiotensina II. Estudios experimentales han demostrado que las CEH son estimuladas por el acetaldehído, por productos de la peroxidación lipídica y por la disminución de sustancias antioxidantes como el GSH [12].

El TNF- α ha sido considerado tradicionalmente una citocina clave en la patogenia de la EHA. La mitocondria es la organela blanco por excelencia de la acción del TNF, que induce apoptosis en hepatocitos por activación de diferentes vías. Este efecto es principalmente mediado por el receptor 1 de TNF (TNFR-1). Mientras que el receptor 2 de TNF (TNFR-2) potencia los efectos iniciados por la activación de TNFR-1 [23]. La unión del TNF- α al TNFR-1 lleva al reclutamiento de varias proteínas adaptadoras que activan

la cascada de quinasas (JUNK) desencadenando la proliferación celular (Figura 3A). El TNF- α también activa la caspasa 8, la cual cliva la proteína citosólica Bid, un miembro de las proteínas relacionadas con Bcl-2. Esta forma truncada de Bid es redistribuida a las membranas mitocondriales y permite la liberación de factores mitocondriales que incluye citocromo *c* oxidasa, que activa caspasa 3 y finalmente ocasiona la muerte celular por apoptosis (Figura 3B). Además, el TNF- α participa en la inducción de la esfingomielinasa incrementando la producción de ceramida, un inhibidor de la actividad de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, y resulta en la producción mitocondrial de ROS, que promueve la peroxidación lipídica y la necrosis celular (Figura 3C). Las ROS contribuye a la activación de factores de transcripción sensibles a oxidantes como el NF- κ B, necesarios para la síntesis de factores de supervivencia celular que protegen a la mitocondria (Figura 3D). De tal manera, que los hepatocitos responden a la acción del TNF- α a través de la modulación de señales que pueden llevar a apoptosis y necrosis, así como también a señales que promueven la supervivencia y proliferación celular [24, 25]. El efecto citotóxico del TNF- α puede ser incrementado a nivel hepático por la depleción mitocondrial de GSH y por el incremento de la peroxidación lipídica, ocurriendo como consecuencia la apoptosis de los hepatocitos dañados por el alcohol. Sin embargo, los hepatocitos parecen ser resistentes a la acción pro-apoptótica del TNF- α , por un mecanismo mediado por la acción anti-apoptótica del NF- κ B [26].

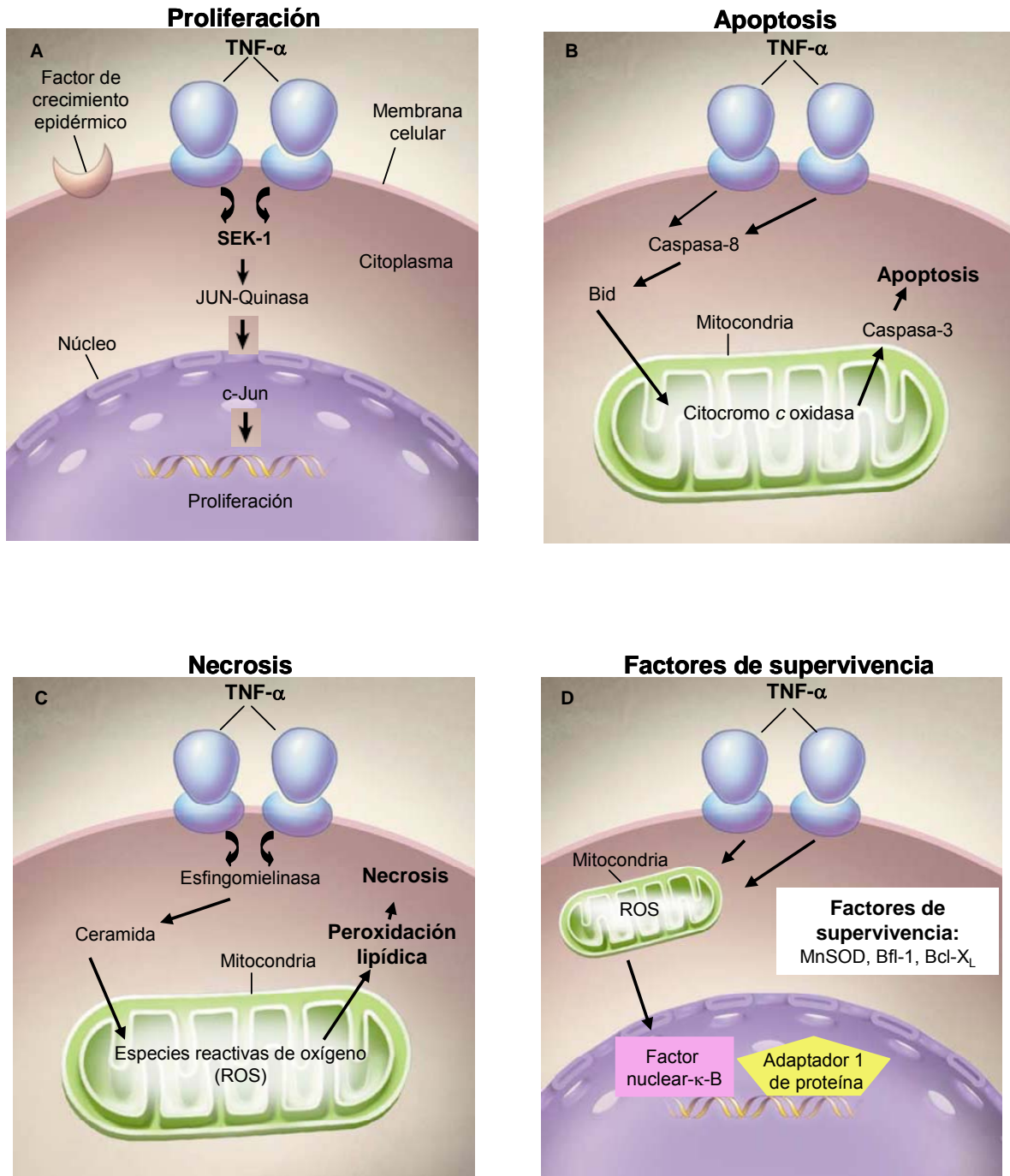


Figura 3. Respuesta del hepatocito al TNF- α . Extraído de Tilg et al. [24].

El riesgo de desarrollar EHA se asocia no sólo a la ingesta de alcohol sino también a factores genéticos que influyen en el desarrollo de la enfermedad [12]. De hecho, se cree que el alcoholismo resulta de la interacción entre la predisposición genética y factores medioambientales. Enzimas como la ADH, ALDH y CYP2E1

presentan polimorfismos funcionales que parecen proteger del desarrollo del alcoholismo a través de la producción más rápida o el metabolismo más lento del acetaldehído, el cual produce efectos biológicos displacenteros [18]. Estos polimorfismos también pueden teóricamente prevenir el desarrollo de EHA [17]. Asimismo, polimorfismos en genes que codifican citocinas, como TNF- α o IL-10, se han asociado con esteatohepatitis alcohólica más acentuada y con un mayor desarrollo de fibrosis, respectivamente [17, 27]. Polimorfismos en la región promotora del gen CD14, que se asocia a un incremento en la síntesis proteica, produce una mayor susceptibilidad a desarrollar cirrosis hepática alcohólica. Variaciones genéticas de la superóxido dismutasa, un potente antioxidante, también son un factor de riesgo para el desarrollo de EHA avanzada [27].

1.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la EHA se puede establecer por una historia de ingesta de alcohol abusiva y prolongada, así como por la presencia de signos físicos y de alteraciones bioquímicas en las pruebas de laboratorio. En ocasiones, el diagnóstico de alcoholismo o abuso de alcohol puede ser difícil de establecer, pues los pacientes minimizan o niegan el abuso de alcohol. La herramienta más frecuentemente utilizada para evaluar dependencia alcohólica es el cuestionario de CAGE [10]. Este cuestionario es un método de despistaje que fue descrito por primera vez en 1968 para detectar bebedores rutinarios y ha sido validado posteriormente en múltiples estudios. El cuestionario incluye 4 preguntas [28]:

- 1- ¿Ha sentido alguna vez que debe beber menos?
- 2- ¿Le ha molestado que la gente lo critique por su forma de beber?
- 3- ¿Alguna vez se ha sentido mal o culpable por su forma de beber?
- 4- ¿Alguna vez ha necesitado beber por la mañana al despertarse?

Dos respuestas positivas indican dependencia alcohólica con una sensibilidad > 70% y una especificidad > 90%. Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunos pacientes pueden desarrollar EHA sin tener dependencia alcohólica por tener una mayor susceptibilidad al alcohol [10]. Un esquema para el abordaje inicial de la EHA se muestra en la figura 4.

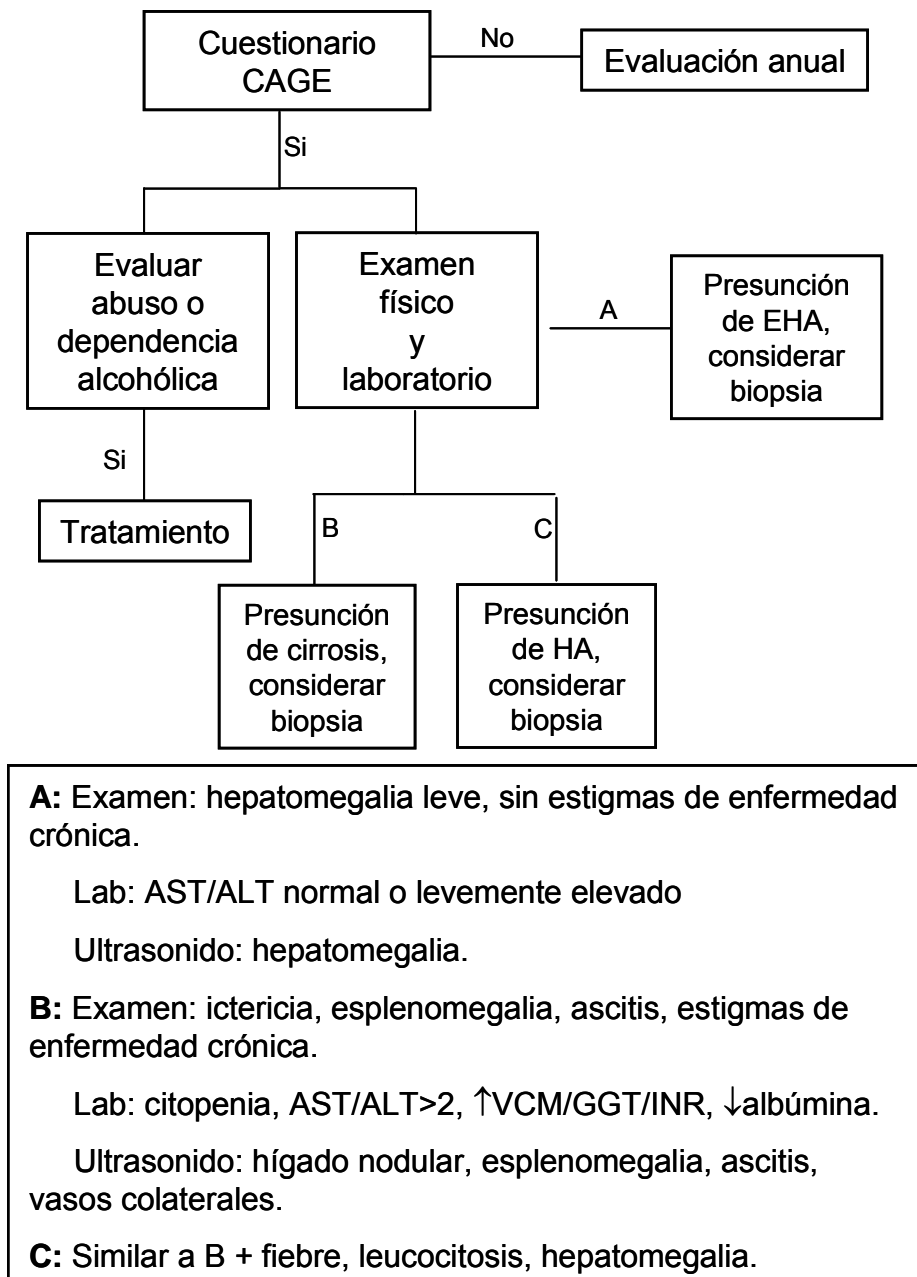


Figura 4: Algoritmo de despistaje y diagnóstico de la EHA. Extraído de Levitsky et al. [1].

Existen algunos marcadores serológicos que permiten detectar el abuso de alcohol a través de la evaluación del daño hepático, pero tienen una sensibilidad y especificidad menor del 70%. Estos incluyen elevación de los niveles de aspartato y alanino aminotransferasa (AST y ALT, respectivamente), una elevación de la razón AST/ALT y una elevación de los niveles de γ -glutamyl transpeptidasa (GGT). Otros como el volumen corpuscular medio (VCM) que aumenta debido a la toxicidad del alcohol sobre la médula ósea, también pueden ser usados, pero tienen una baja sensibilidad y especificidad diagnóstica (<50%) [8]. Niveles elevados de transferrina deficiente de carbohidrato es una prueba más sensible, pero tiene limitaciones debido a que la sobrecarga o deficiencia de hierro disminuye su exactitud diagnóstica [12].

El diagnóstico clínico se basa en una anamnesis precisa y en una exploración física exhaustiva. La esteatosis simple suele ser asintomática, mientras que pacientes con esteatohepatitis suelen tener síntomas. Los pacientes con cirrosis compensada generalmente no presentan síntomas a menos que tengan HA asociada. En la medida que la cirrosis avanza aparecen signos de descompensación como ascitis, encefalopatía hepática, sangrado por várices esofágicas y/o esplenomegalia palpable. También son comunes la presencia de arañas vasculares en cara y tórax, contractura palmar de Dupuytren, agrandamiento de las glándulas parótidas y lacrimales y presencia de acropaquia en pacientes con cortocircuitos arteriovenosos pulmonares [10].

El diagnóstico clínico y analítico de la EHA es sensible (80-91%) y específico (96%), con un valor predictivo positivo y negativo de 88% y 97%, respectivamente. Por tanto, la indicación de la biopsia hepática en estos pacientes es controvertida [10]. La biopsia suele ser útil para confirmar el diagnóstico de HA antes de iniciar tratamiento farmacológico, cuando existe la duda diagnóstica o para proveer información pronóstica [1]. Recientes estudios han intentado evaluar marcadores no invasivos de fibrosis en

pacientes con EHA. Marcadores séricos de fibrosis como los colágenos I, III y IV, laminina y el péptido N-terminal de procolágeno tipo III (PIIINP) han sido utilizados para el diagnóstico no invasivo de la EHA y se correlacionan no sólo con fibrosis sino también con necrosis e inflamación. La laminina y el colágeno IV parece estar asociado con la intensidad de las lesiones histológicas en pacientes con HA [29]. El FibroTest es un método no invasivo para evaluar fibrosis, inicialmente validado en pacientes con hepatitis crónica C [30]. El FibroTest incluye 5 marcadores bioquímicos séricos: α -2 macroglobulina, apolipoproteína A1, haptoglobina, GGT y bilirrubina. Esta prueba permite diferenciar principalmente fibrosis leve de fibrosis avanzada [31]. En un meta-análisis realizado para evaluar la precisión de este método en pacientes con enfermedad hepática de diferentes etiologías, encontraron que el FibroTest tiene una excelente exactitud diagnóstica para diferenciar fibrosis leve de fibrosis avanzada en pacientes con EHA [30]. En otro estudio publicado recientemente se evaluó marcadores no invasivos de estrés oxidativo (GSH total en sangre fresca, GSH reducido y oxidado en plasma, selenio, vitaminas A, C y E), de peroxidación lipídica (8-isoprostano en orina y suero, sustratos de ácido 2-tiobarbitúrico), de inflamación y fibrosis (proteína C reactiva, AST, ALT, GGT, fosfatasa alcalina, proteína total, albúmina, bilirrubina, urato y PIIINP séricos) en pacientes con cirrosis alcohólica y demostraron que estos pacientes tienen niveles elevados de marcadores de estrés oxidativo, peroxidación lipídica, fibrogénesis e inflamación. Estos marcadores podrían ser de utilidad en la monitorización de pacientes con EHA que reciban tratamiento antioxidante [32].

1.1.4. Tratamiento

El manejo terapéutico de la EHA depende de la gravedad de la hepatopatía [8]. Existe consenso en que la abstinencia alcohólica es fundamental en el manejo de esta enfermedad. De hecho, la esteatosis hepática simple puede revertir tras una abstinencia

alcohólica sostenida [4, 8, 10]. Pacientes con esteatohepatitis o cirrosis alcohólica pueden frenar la progresión de la enfermedad y mejorar la supervivencia si se mantienen abstinentes. Es posible que en algunos casos, la cirrosis hepática pueda ser incluso reversible. Otras modificaciones en el estilo de vida son favorables en el manejo de esta enfermedad. Así, se ha demostrado que el tabaco acelera la progresión de la fibrosis en EHA asociada o no a infección por el virus de la hepatitis C [10].

Pacientes con EHA progresiva generalmente están malnutridos, debido a una pobre ingesta alimentaria, anorexia y al desarrollo de complicaciones asociadas a la cirrosis hepática como es la encefalopatía. Mantener un balance nitrogenado positivo con un soporte nutricional adecuado es vital en estos pacientes para mejorar la supervivencia [8]. Por tanto, la abstinencia alcohólica sostenida junto a un adecuado soporte nutricional son estrategias claves en mejorar la supervivencia y frenar la progresión de la EHA.

Pacientes con cirrosis hepática y con HA pueden desarrollar complicaciones asociadas a la hipertensión portal, como encefalopatía hepática, hemorragia variceal, ascitis, peritonitis bacteriana espontánea y síndrome hepatorenal, requiriendo del manejo terapéutico específico de estas complicaciones [8].

El tratamiento de la enfermedad hepática avanzada incluye el trasplante hepático. La supervivencia a largo plazo post-trasplante es excelente y es la segunda causa de trasplante hepático a nivel mundial. Sin embargo, debido a la baja disponibilidad de órganos para el trasplante, una condición en la mayoría de los centros para trasplantar a estos pacientes es la abstinencia alcohólica durante al menos 6 meses. Esto lleva al fallecimiento de muchos pacientes en lista de espera de trasplante hepático. Además, muchos de estos pacientes no pueden ser trasplantados por falta de apoyo familiar, problemas psiquiátricos asociados o por la coexistencia de afectación grave de otros

órganos por el alcohol (por ej.: cardiomiopatía) [4]. La recidiva de la ingesta alcohólica ocurre en 20 a 50% de los casos después de 5 años del trasplante hepático. Sin embargo, únicamente el 15% recaen con una ingesta elevada de alcohol, de los cuales sólo el 5% desarrollarán enfermedad hepática grave [33].

1.2. HEPATITIS ALCOHÓLICA

1.2.1. Concepto

La HA forma parte del espectro de la EHA y se caracteriza por un empeoramiento de la función hepática en pacientes con abuso de alcohol. Histológicamente se caracteriza por la presencia de esteatosis hepática, daño hepatocelular, infiltrado inflamatorio predominantemente de polimorfonucleares y fibrosis pericelular [26]. La HA es una entidad que ocurre en el contexto de un incremento de la ingesta de alcohol y puede complicar el hígado graso alcohólico o la cirrosis hepática pre-existente, asociándose a una elevada mortalidad a corto plazo en pacientes con formas graves de la enfermedad [26].

La prevalencia real de la HA es desconocida ya que frecuentemente es subdiagnosticada. Sin embargo, basado en la prevalencia del alcoholismo, se estima que el 10 a 35% de los alcohólicos tienen cambios de HA en la biopsia hepática [6, 34]. La HA no es un proceso benigno y algunos pacientes pueden desarrollar complicaciones fatales. Además, incrementa el riesgo de desarrollar cirrosis hepática, detectándose cirrosis hepática en el 40% de estos pacientes en el transcurso de 5 años. En un pequeño porcentaje de casos con HA, el daño hepático y la función hepática puede revertir tras la abstinencia alcohólica sostenida [6].

1.2.2. Patogenia

La patogenia de la HA no está bien caracterizada debido a la ausencia de un modelo experimental y a que los resultados obtenidos de estudios en humanos son escasos. La HA implica diferentes procesos inflamatorios y hepatocelulares, incluyendo la potencial afectación de respuestas inmunológicas y adaptativas [35]. La interacción entre

citocinas e infiltrado inflamatorio, así como la presencia de factores que regulan el reclutamiento de leucocitos en el hígado pueden ser cruciales en el desarrollo de la HA [36, 37]. El alcohol se absorbe en el estómago y en la porción proximal del intestino delgado y es metabolizado en el hígado por 3 rutas metabólicas, las cuales llevan a la producción de acetaldehído, como se comentó previamente. Los metabolitos del alcohol pueden producir daño hepático por diferentes vías: aumento de la permeabilidad intestinal, estrés oxidativo (empeoramiento de la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos, depleción de GSH, peroxidación lipídica y formación de radicales libres de oxígeno) e incremento de la fibrogénesis [34] (Figura 5).

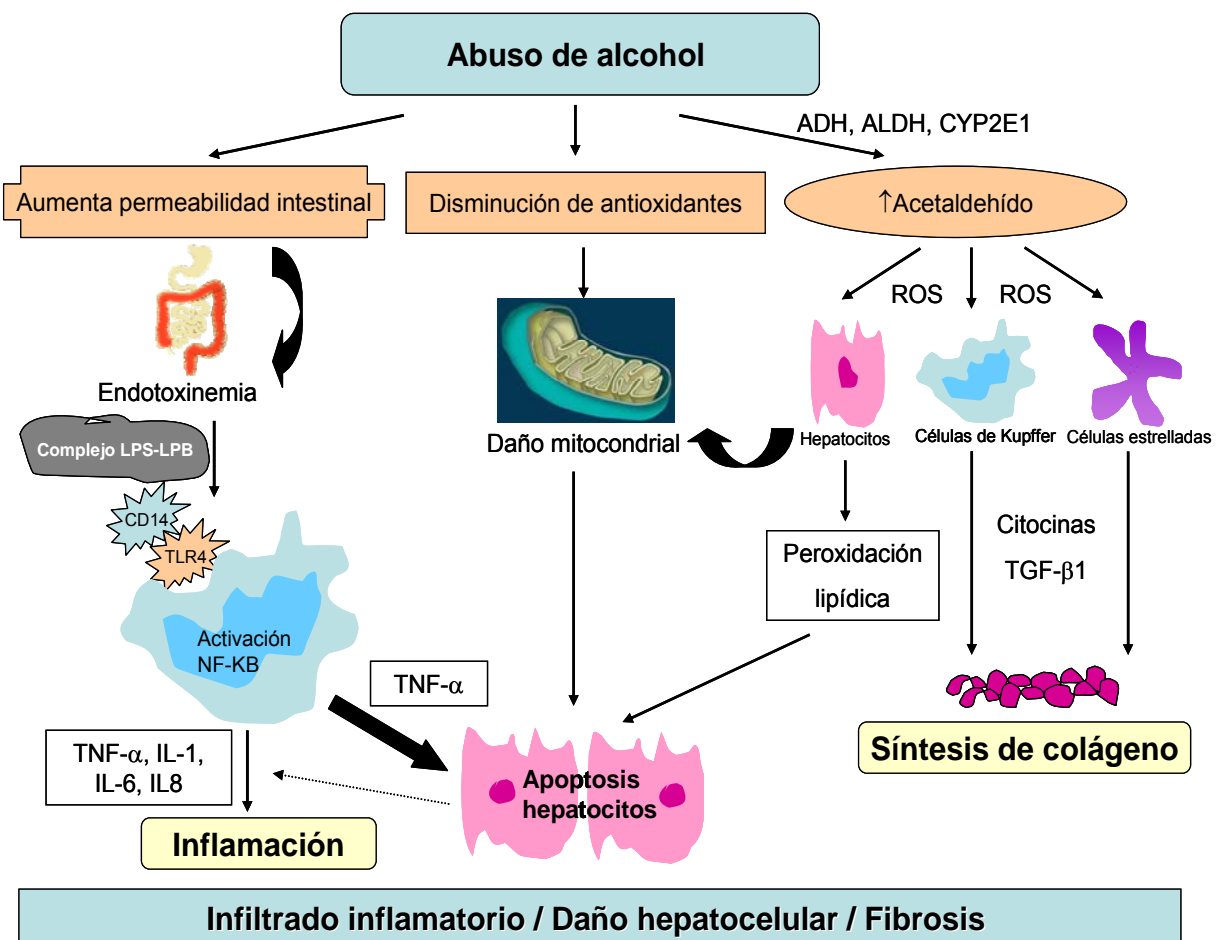


Figura 5. Patogénesis de la Hepatitis Alcohólica.

La apoptosis es la vía por la que los organismos multicelulares mantienen un equilibrio entre la replicación y la muerte a través de la muerte celular programada. Este fenómeno puede ocurrir sin que le preceda inflamación. Las células apoptóticas se disocian de las células vecinas, condensan su cromatina y fragmentan su ADN. Finalmente la célula divide el citoplasma y el núcleo en pequeños cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos expresan fosfatidilserina en la superficie de la membrana plasmática y son fagocitadas y digeridas principalmente por macrófagos y células parenquimatosas circundantes. Los hepatocitos son susceptibles a la apoptosis principalmente inducida por Fas, la cual es una proteína de superficie que participa en los procesos de muerte celular [38]. En pacientes con HA se ha encontrado que la apoptosis de hepatocitos es una característica prominente y que el número de células apoptóticas se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Además, la apoptosis en estos pacientes está asociada al incremento en la expresión de Fas y no de TNFR1 [39]. Estos datos sugieren que la apoptosis podría jugar un papel importante en la fisiopatología de la HA. Por otra parte, en estudios experimentales se ha encontrado que los cuerpos apoptóticos acumulados localmente estimulan las células de Kupffer para la producción de citocinas pro-inflamatorias, perpetuando así la cascada inflamatoria [40]. Zioli *et al.*, demostraron que en pacientes con HA la apoptosis de hepatocitos se localiza en los nódulos cirróticos y principalmente en áreas con marcada infiltración inflamatoria [41]. Estos resultados pueden apoyar la hipótesis que la trans migración de neutrófilos puede ser dependiente de apoptosis. En este mismo estudio demostraron que el índice de hepatocitos apoptóticos se correlaciona con la gravedad de la HA, con la presencia de ascitis y con el nivel de bilirrubina sérica [41].

Una de las principales características de la HA es la infiltración hepática por neutrófilos, habitualmente asociado a neutrofilia, que no suele encontrarse en otras enfermedades hepáticas como la hepatitis crónica C [21]. Como se comentó previamente,

el alcohol produce un aumento de la permeabilidad intestinal a las endotoxinas que lleva a un incremento en la producción de citocinas por los macrófagos y células de Kupffer. Estas citocinas pueden atraer células inflamatorias principalmente neutrófilos al tejido hepático y por el otro lado ejercer un papel citotóxico sobre el hígado [34]. Los neutrófilos se acumulan en los sinusoides, en las vénulas post-sinusoidales o en las vénulas portales hepáticas. La acumulación de neutrófilos es principalmente dependiente de moléculas de adhesión celular en los sinusoides hepáticos. Estas células inicialmente son atrapadas en los sinusoides debido a razones mecánicas que incluye el edema de células endoteliales y de Kupffer y a las propiedades reológicas de los neutrófilos que luego migran fuera de los sinusoides hepáticos. Existen varios mediadores que promueven la acumulación de neutrófilos en los sinusoides hepáticos, incluyendo el TNF- α , la IL-1, factores activados del complemento, factor activador de plaquetas y las quimiocinas CXC [42].

La extravasación es un pre-requisito para que los neutrófilos produzcan toxicidad. En la extravasación participan moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1), moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) y su contra-receptor (β -1 integrinas) localizadas en las células endoteliales y β -2 integrinas (CD11/CD18) localizadas en los neutrófilos. Los neutrófilos extravasados se adhieren a los hepatocitos a través del antígeno 1 asociado a la función de leucocitos (LFA-1), que se une a su contra-receptor en los hepatocitos (ICAM-1). Esta interacción produce daño de los hepatocitos mediado por liberación de ROS y proteasas, dando como resultado varios grados de degeneración y necrosis hepatocelular [43]. En la transmigración de neutrófilos participan señales que disparan la extravasación, una de ellas son la familia de las quimiocinas CXC, las cuales son potentes quimiotácticos de neutrófilos. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual esto ocurre se desconoce [43].

Existen evidencias que diversas quimiocinas (citocinas quimiotácticas) juegan un papel en la HA. Las quimiocinas son una familia de citocinas que estimulan la migración celular [44, 45]. El principal papel de las quimiocinas es el reclutamiento de leucocitos en los sitios de inflamación [46, 47] (Figura 6). Se ha identificado múltiples quimiocinas, pero principalmente se encuentran agrupadas en 4 subfamilias basadas en los residuos de cisteína que conservan: quimiocinas CC, CXC, C y CX3C. El MCP-1 (proteína 1 quimioatrayente de monocitos) es la principal quimiocina del subgrupo CC. Es una citocina atrayente de monocitos y basófilos, pero también estimula a un subgrupo de linfocitos CD4+, CD8+ y linfocitos T de memoria [48]. Otra quimiocina de este grupo es el MIP-1 α (proteína 1 α inflamatoria de macrófagos) e igualmente es quimiotrayente de monocitos y linfocitos. Fisher *et al.* demostraron que pacientes con HA tienen niveles séricos elevados de MCP-1 en comparación con controles sanos, pero estos niveles no se asocian con el pronóstico de la enfermedad. Además, la secreción de MCP-1 y de MIP-1 α por los monocitos está elevada en pacientes con HA grave [46]. Aunque la relevancia de estos hallazgos se desconoce, es probable que jueguen un papel en la patogénesis de la HA. Otra citocina perteneciente al grupo de quimiocinas CC es RANTES (CCL5), que es principalmente atrayente de linfocitos T. RANTES es producida por fibroblastos, linfocitos T, células endoteliales y monocitos. Estudios experimentales *in vitro* en daño hepático inducido por alcohol han encontrado que RANTES es transcripcionalmente inducida por TNF- α , a través de la activación de NF- κ B [49]. Sin embargo, en pacientes con HA, no hay datos que sugieran que esta quimiocina juegue un papel en la patogénesis de la enfermedad [50].



Figura 6: Funciones biológicas de las quimiocinas y sus receptores.

Las quimiocinas CXC se caracterizan por ser atrayentes de neutrófilos. Estas quimiocinas pueden ser subclasificadas en dos grupos ELR^+ y ELR^- basado en la presencia o ausencia del tripéptido ELR (Glu-Leu-Arg) en el extremo aminoterminal [51]. Las quimiocinas ELR^+ tienen la capacidad de atraer neutrófilos a los tejidos inflamados, a través de múltiples procesos (enrolamiento, adhesión y trans migración), permitiendo que los neutrófilos pasen de la circulación a los tejidos periféricos. Este proceso ocurre como resultado de cambios moleculares en la superficie del endotelio en respuesta a estímulos inflamatorios [51]. Dentro del grupo de las quimiocinas CXC se encuentra como prototipo principal la IL-8, pero también pertenecen a este grupo Gro- α (CXCL1), Gro- β (CXCL2), Gro- γ (CXCL 3), proteína epitelial activadora de neutrófilos (ENA-78 o CXCL5), proteína 2 quimiotáctica de granulocitos (GCP-2 o CXCL6). Este grupo de quimiocinas pertenecen al subgrupo ELR^+ [48]. Mientras que quimiocinas como el factor plaquetario 4 (PF4 o CXCL4) y la proteína inducida por interferón gamma (γ IP10 o CXCL10) entre otras, pertenecen al grupo de quimiocinas CXC ELR^- [52]. La IL-8 es la quimiocina CXC ELR^+ más ampliamente estudiada y es producida por varios tipos celulares como monocitos,

macrófagos alveolares, neutrófilos, queratinocitos, células mesangiales, hepatocitos, células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales, generalmente en respuesta a la acción del TNF y de la IL-1 [52].

Los receptores de quimiocinas son receptores transmembrana acoplados a proteína G. Se expresan principalmente en neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos [48]. Se agrupan según la subfamilia de quimiocinas y de acuerdo a la habilidad que tienen para unirse a ellas. Todos los receptores se unen a uno ó más ligandos del mismo subgrupo [45]. Se han identificado 6 receptores que se unen a las quimiocinas CXC: CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5 y CXCR6 (Tabla 3). Las quimiocinas CXC ELR+ se unen a los receptores CXCR1 y CXCR2, mientras que las ELR- se unen al receptor CXCR3 [51].

Tabla 3: Quimiocinas CXC y sus receptores.

Receptores	Ligandos
CXCR1	IL-8, CXCL 6 (GCP-2)
CXCR2	IL-8, CXCL1 (Gro- α), CXCL2 (Gro- β), CXCL3 (Gro- γ), CXCL 5 (ENA-78), CXCL6
CXCR3A	CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10), CXCL11 (I-TAC)
CXCR3B	CXCL4 (PF4), CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16

Los receptores específicos de las quimiocinas CXC ELR⁺, CXCR1 y CXCR2, se localizan en la superficie celular. Ambos tienen alta afinidad tanto por la IL-8 como por CXCL6, mientras que el CXCR2 se une con alta afinidad a las otras quimiocinas CXC ELR⁺. Hay evidencias que CXCR1 tiene un papel dominante en la quimiotaxis de neutrófilos por acción de la IL-8 y que CXCR2 interviene principalmente en la angiogénesis y proliferación celular [51]. Estos hallazgos pueden tener implicaciones terapéuticas, ya que el bloqueo de receptores CXCR1 y R2 disminuye la excesiva

infiltración de neutrófilos durante el proceso inflamatorio agudo [44]. Las quimiocinas CC se unen a los receptores CCR1 hasta el CCR10, el receptor XCR1 se une a la quimiocina C (linfotactina) y el receptor CX3CR1 se une a la quimiocina fractalkina (CX3C) [44, 53].

En pacientes con HA se ha encontrado que los niveles hepáticos de Gro- α e IL-8 se encuentran elevados y relacionados entre sí. Estos hallazgos sugieren que la infiltración hepática de neutrófilos puede estar relacionada con el incremento de la expresión hepática de estas quimiocinas CXC [50]. Estos datos han sido corroborados por un estudio realizado en nuestro grupo donde se demostró que pacientes con HA tienen un aumento de la expresión hepática de Gro- α , esta expresión se asocia con la gravedad y la mortalidad a corto plazo [54] (Figura 7).

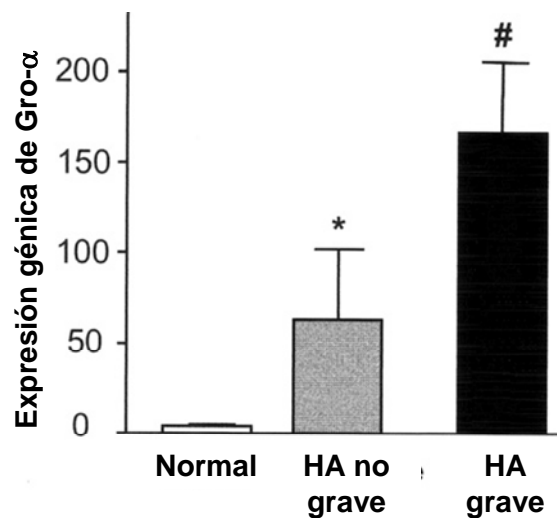


Figura 7: Correlación de la expresión génica hepática de Gro- α en pacientes con hepatitis alcohólica. * $p < 0,001$ (normales vs hepatitis alcohólica no grave). # $p < 0,001$ (hepatitis alcohólica grave vs. no grave). Extraído de Colmenero et al [54].

1.2.3. Historia natural

La historia natural de la HA es variable y depende de la gravedad clínica y de la abstinencia alcohólica del paciente tras el diagnóstico. El riesgo de desarrollar cirrosis hepática está incrementado en estos pacientes y puede asociarse a algún tipo de descompensación clínica. La probabilidad de desarrollar cirrosis es de 10 a 20% por año, y aproximadamente el 70% de los pacientes con HA finalmente tendrán cirrosis hepática. En un pequeño porcentaje de casos, los cambios pueden revertirse y la histología y la función hepática normalizarse. Sin embargo, esto ocurre en sólo el 10% de los pacientes que consiguen la abstinencia alcohólica mantenida [6]. Desde el punto de vista histológico, la esteatosis hepática puede desaparecer a las 3-4 semanas, el balonamiento de hepatocitos y los cuerpos de Mallory lo hacen entre las 6 y las 12 semanas, y las áreas de necrosis se convierten en cicatrices fibrosas en aproximadamente 3 meses. Por el contrario, si el consumo alcohólico continúa suele progresar a cirrosis, con la aparición de descompensaciones clínicas o el desarrollo de CHC [55].

El síndrome de la HA comprende un amplio espectro clínico que va desde el paciente asintomático con leve inflamación en la biopsia hepática hasta el paciente gravemente enfermo con una mortalidad elevada [3]. El pronóstico de estos pacientes es más variable. La mortalidad a corto plazo (3 meses) varía del 15% al 55% para aquellos pacientes con HA leve o grave, respectivamente [56]. La mortalidad está asociada con la gravedad de la enfermedad en el momento del diagnóstico y con el consumo continuado de alcohol [12]. Factores hepáticos y extrahepáticos contribuyen a las causas de muerte de estos pacientes, siendo las más frecuentes la insuficiencia hepática y la sepsis [12]. Las formas graves de la enfermedad suele presentarse con ictericia acentuada, trastornos de coagulación por déficit en la síntesis de factores de la coagulación, hemorragia digestiva secundaria a varices esofágicas, encefalopatía hepática,

infecciones bacterianas y/o síndrome hepatorenal que finalmente pueden desencadenar fallo multiorgánico acompañado de coagulación intravascular diseminada y muerte [34].

1.2.4. Diagnóstico

Los pacientes con HA presentan síntomas constitucionales como anorexia, fiebre, fatiga, pérdida de peso, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Las formas graves de la enfermedad generalmente se asocian con ictericia y síntomas avanzados de hipertensión portal, incluyendo sangrado gastrointestinal de origen variceal, ascitis, encefalopatía hepática y síndrome hepatorenal [8]. Además, suelen estar presentes estigmas de hepatopatía y enolismo crónico. Otros signos asociados con toxicidad extrahepática por el alcohol también suelen estar presentes, tales como malnutrición, neuropatía periférica o cardiomiopatía [8, 26].

Desde el punto de vista bioquímico, la HA se caracteriza por la presencia de una moderada elevación de AST y ALT (< 10 veces de lo normal), razón AST/ALT > 2, hiperbilirrubinemia mixta, incremento del tiempo de protrombina y leucocitosis con neutrofilia. Estudios de imágenes principalmente ecografía y TAC abdominal son utilizados para excluir otras patologías como colecistitis, obstrucción biliar, trombosis venosa portal y tumores. Además, suelen aportar datos sobre el grado de esteatosis, la presencia de signos de hepatopatía crónica y/o hipertensión portal. Los datos clínicos y analíticos pueden ser suficientes para el diagnóstico de la HA, pero a menudo la biopsia hepática es necesaria si el diagnóstico es dudoso o para evaluar el grado de daño hepático [26]. Debido a los trastornos de coagulación en la mayoría de los pacientes con HA, el abordaje de la biopsia hepática se realiza por vía transyugular para disminuir las complicaciones de sangrado y con la ventaja de poder medir el gradiente de presión

venosa portal (GPVH). Pacientes con HA tienen un mayor grado de hipertensión portal en comparación con pacientes con cirrosis alcohólica o viral. Este incremento de la presión portal puede estar en relación con la fibrosis y el incremento de mediadores vasoactivos [57].

También se ha demostrado que pacientes con HA tienen un aumento del diámetro de la arteria hepática en la angiografía y se describe como el signo de “canales pseudoparalelos” [58]. Más recientemente, la ultrasonografía Doppler duplex ha sido utilizada para caracterizar la resistencia y los índices pulsátiles de la arteria hepática en pacientes con enfermedad hepática de origen alcohólico y viral. Pacientes con HA tienen una disminución del índice de resistencia hepática comparado con los controles. Sin embargo, no existen diferencias entre pacientes con EHA sin inflamación y pacientes con HA. Esto puede deberse al efecto vasodilatador del etanol o sus metabolitos [59]. Otro estudio ha encontrado que el diámetro de la arteria hepática evaluado por ultrasonografía Doppler duplex está elevado en pacientes con HA en comparación con individuos sanos y cirróticos por alcohol, así como el índice de resistencia hepática se encuentra disminuido en pacientes con HA. Sin embargo, estos hallazgos no se correlacionaron con gravedad de la HA [60].

1.2.5. Hallazgos histológicos

La biopsia hepática de los pacientes con HA permite establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad y evaluar la intensidad del daño hepático. La HA se caracteriza histológicamente por la presencia de esteatosis, balonamiento de hepatocitos, presencia de cuerpos acidófilos, hialina de Mallory, infiltrado inflamatorio predominantemente de neutrófilos y fibrosis pericelular [26, 55] (Figura 8). Para el diagnóstico de HA es obligatorio la presencia de daño hepatocelular (usualmente

degeneración por balonamiento de hepatocitos, necrosis hepatocelular y presencia de cuerpos de Mallory), infiltrado inflamatorio de neutrófilos y presencia de fibrosis pericelular. Otros hallazgos histológicos también suelen estar presentes, pero no son indispensables para el diagnóstico como es la presencia de cambios grasos, necrosis en puentes, proliferación de conductos biliares, cuerpos acidófilos, megamitocondrias y colestasis, entre otros [55].

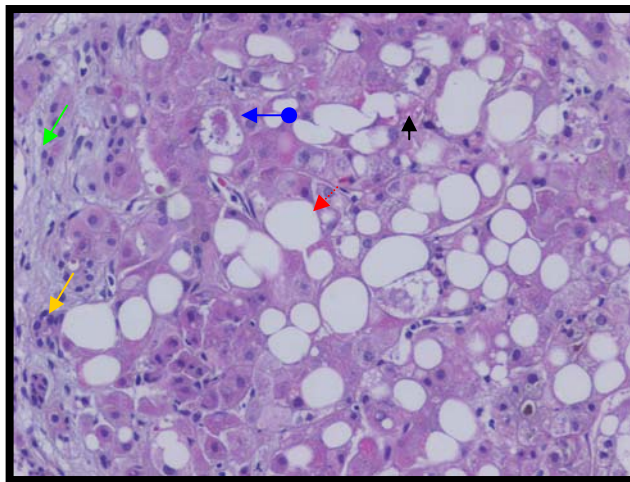


Figura 8: Corte histológico hepático que muestra hepatocitos con hialina de Mallory (flecha negra), balonamiento de hepatocitos (flecha azul), infiltrado inflamatorio (flecha amarilla), esteatosis (flecha roja) y fibrosis pericelular (flecha verde). Tinción H&E.

La esteatosis macro-microvesicular ocurre por la inhibición de la oxidación de ácidos grasos debido a un aumento de la oxidación del etanol. El balonamiento de los hepatocitos resulta de la secreción alterada de agua y proteínas secundario a la disrupción de la función de los microtúbulos ocasionada por el acetaldehído [12]. Microscópicamente se caracteriza por hepatocitos edematosos con citoplasma pálido granular [55]. La hialina de Mallory son agregados intracelulares de color rosado oscuro que son debido a la desorganización citoplasmática de los filamentos intermedios e involucra citoqueratina 8 y 18 [12]. Microscópicamente se observan como inclusiones

intracitoplasmáticas perinucleares de color rosado [55]. El infiltrado inflamatorio comprende principalmente neutrófilos que rodean a los hepatocitos necróticos o que contienen hialina de Mallory y se distribuyen tanto intra como extra-sinusoidal. Sin embargo, también están presentes células mononucleares [12, 55]. La fibrosis comienza en la zona 3 del lóbulo hepático alrededor de la vena central como resultado de la hipoxia relativa y por eso se denomina fibrosis perivenular. Generalmente las fibras de colágeno se encuentran cercanas a los hepatocitos balonados. Esta fibrosis pericelular suele tener una apariencia en “cresta de pollo” que rodea los hepatocitos lobulillares [12, 55]. La cirrosis hepática está presente en el 90% de los pacientes con HA grave. Los cuerpos acidófilos representan la apoptosis de los hepatocitos [12]. Las megamitocondrias se observan como inclusiones globulares intracitoplasmáticas rodeados de un halo y generalmente, en los hepatocitos balonados [55].

Dentro del espectro histológico de la HA puede observarse tres patrones: a) HA mínima, b) HA completamente desarrollada, y c) HA avanzada. Las lesiones mínimas se caracterizan por el balonamiento y necrosis de algunos hepatocitos, presencia ocasional de hialina de Mallory y un leve infiltrado inflamatorio. Estas lesiones suelen ser focales y generalmente localizadas en zonas centrolobulillares y con poca fibrosis. La HA completamente desarrollada se caracteriza por afectación de la mayoría de las zonas centro-lobulillares, con acentuado balonamiento y necrosis hepatocelular que producen áreas confluentes, intenso infiltrado inflamatorio predominantemente de neutrófilos, pero con presencia de linfocitos e hiperplasia de células de Kupffer. Los cuerpos de Mallory están presentes en la mayoría de los casos y la fibrosis pericelular está presente con fibras cercanas a los hepatocitos dañados. En casos más graves, se observa necrosis en puente centro-central y centro-portal. El grado extremo de necrosis centro-lobulillar, llamado necrosis esclerosante hialina, es el resultado de la pérdida hepatocelular en las regiones perivenulares. En la HA avanzada la afectación hepática es extensa

acompañada de desorganización de la arquitectura normal. Están presentes puentes necróticos o septos fibrosos centro-portales y centro-centrales, con áreas de inflamación y daño hepatocelular en la interfase septo/parénquima y la fibrosis pericelular es continua extendiéndose desde los septos hasta las áreas adyacentes del parénquima. Además, los tractos portales pueden contener leve a moderado infiltrado inflamatorio [55]. La presencia de signos de esteatohepatitis alcohólica en los pacientes con abuso crónico de alcohol está asociada a un peor pronóstico dentro del espectro de la EHA [61]. Sin embargo, los hallazgos histológicos en los pacientes con HA no parecen relacionarse con la supervivencia de estos pacientes [62].

1.2.6. Evaluación Pronóstica

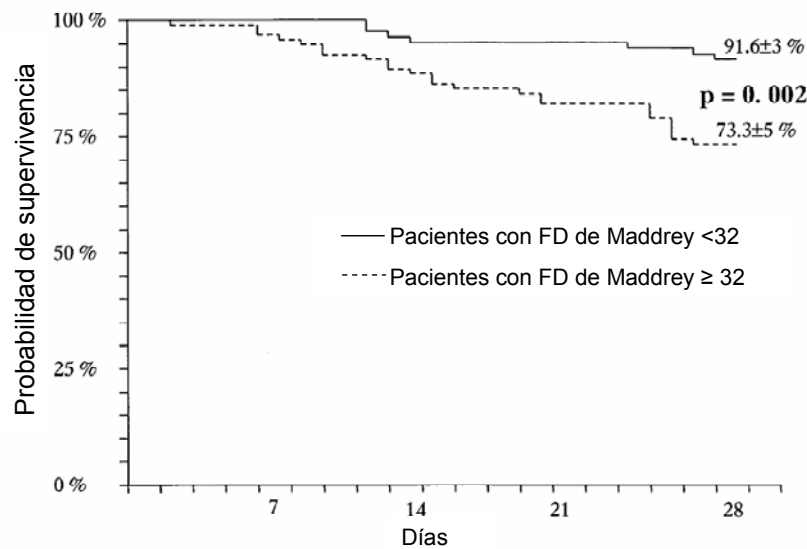
La estratificación pronóstica de la HA es necesaria para tomar decisiones terapéuticas que permitan disminuir la mortalidad a corto plazo. Existen varios índices descritos en la literatura que evalúan el pronóstico de los pacientes con HA. Algunos de los índices utilizados son derivados de su uso en otras enfermedades hepáticas como es el caso de la clasificación de Child-Turcotte-Pugh, una herramienta utilizada para el pronóstico de los pacientes con cirrosis hepática. Los pacientes son catalogados en 3 categorías (A, B y C) tomando en cuenta 5 parámetros: (tiempo de protrombina, bilirrubina sérica, albúmina sérica, presencia de encefalopatía hepática y ascitis) (Tabla 4). Sin embargo, esta clasificación es de gran utilidad y se ha validado en pacientes cirróticos, pero en HA existe evidencia que otros índices predicen mejor la supervivencia de estos pacientes [35].

Tabla 4: Clasificación de Child-Pugh-Turcotte

	Puntaje		
	1	2	3
Encefalopatía	No	Grado 1-2	Grado 3-4
Ascitis	No	Poca	Mucha
Bilirrubina (mg/dl)	< 2	2 a 3	> 3
Albúmina (gr/dl)	> 3,5	2,8-3,4	< 2,8
PT (%)	> 70	40-70	< 40

Estadio A= 5-7 puntos; estadio B= 7-10 puntos y estadio C= 10-15 puntos

Tradicionalmente, el pronóstico de los pacientes con HA, ha sido evaluado utilizando la Función Discriminante (FD) de Maddrey, la cual se derivó de un estudio clínico que evaluó la eficacia del tratamiento corticosteroideo en pacientes con HA [63]. En ese estudio se identificó a la bilirrubina sérica y al tiempo de protrombina como factores pronósticos. El cálculo de la FD de Maddrey incluye: $4,6 \times$ tiempo de protrombina del paciente + bilirrubina sérica (mg/dl). Pacientes con una FD de Maddrey > 93 tienen una mortalidad a corto plazo de 50% mientras que los pacientes con una FD < 93 tienen una mortalidad del 12% [35]. Posteriormente, este índice fue modificado en otro estudio que también evaluó la eficacia del tratamiento con metilprednisolona en pacientes con HA grave. Pacientes con una FD de Maddrey modificada ≥ 32 y presencia de encefalopatía hepática tienen una probabilidad de muerte a 30 días del 50% [34, 56]. Este índice ha sido utilizado ampliamente para decidir tratamiento corticosteroideo en pacientes con una puntuación ≥ 32 . De manera que este valor de corte discrimina la gravedad de la HA (Figura 9).



Supervivencia a los 28 días en pacientes con HA según la FD de Maddrey

Figura 9: Curva de Kaplan-Meier mostrando supervivencia a los 28 días en pacientes con HA. Adaptado de Mendenhal et al. [64].

En un estudio que evaluó retrospectivamente pacientes con HA sin tratamiento con corticosteroides ($n= 89$), demostraron que pacientes con una FD de Maddrey ≥ 32 tenían una mortalidad significativamente más elevada que pacientes con un índice < 32 (39% vs. 16,7%, $p=0,039$). Sin embargo, este índice mostró una baja exactitud para predecir el pronóstico a corto plazo de estos pacientes, mostrando un área bajo la curva de 0.66. Además, el punto de corte de 32 mostró una baja sensibilidad (S) y especificidad (E) (66,7% y 61,7%, respectivamente) para predecir mortalidad a corto plazo [65].

Otro índice que se ha utilizado para estratificar el pronóstico de los pacientes con HA es el índice de MELD (*Model for End Stage Liver Disease*). Este índice fue originalmente derivado de una cohorte de 231 pacientes para evaluar el pronóstico a corto plazo de pacientes con cirrosis hepática a quienes se les realizaba un cortocircuito transyugular portosistémico intrahepático (TIPS) [66]. Posteriormente, ha sido validado

como un predictor independiente de supervivencia en varias cohortes de pacientes con cirrosis hepática y ha reemplazado al índice de Child-Turcotte-Pugh para priorizar a los pacientes en lista de espera de trasplante hepático [67, 68]. Este modelo incluye 3 parámetros: bilirrubina sérica, creatinina sérica y tiempo de protrombina expresado como razón normalizada internacional (INR) [66]. Se han publicado tres estudios retrospectivos que sugieren que el índice de MELD es un buen predictor de supervivencia a corto plazo en pacientes con HA [69-71]. El primer estudio no tuvo confirmación histológica de HA e incluyó solo 34 pacientes. Este estudio demostró que el MELD tiene una exactitud similar a la FD de Maddrey para predecir mortalidad a 30 días utilizando un valor de corte de 11 puntos [70]. Dunn *et al.* también reportó que el MELD era equivalente a la FD de Maddrey para predecir mortalidad a 30 y 90 días en pacientes con HA. Sin embargo, en el análisis multivariado, sólo el MELD fue predictor independiente de mortalidad a 90 días [69]. Srikureja *et al.* compararon el MELD, la FD de Maddrey la clasificación de Child-Pugh-Turcotte, y encontraron que no había diferencias entre estos índices para predecir mortalidad a corto plazo en pacientes con HA. Sin embargo, el cambio del MELD a la primera semana tuvo una mejor exactitud pronóstica en comparación con los otros dos índices [71]. En estos estudios donde se ha evaluado el MELD como índice pronóstico en pacientes con HA, el valor de corte con mejor sensibilidad y especificidad para predecir mortalidad a corto plazo en pacientes con HA es controvertido y no permite una correcta estratificación pronóstica de los pacientes.

Forrest *et al.* describieron el índice de HA de Glasgow (*Glasgow Alcoholic Hepatitis Score, GAHS*), el cual es un predictor de mortalidad a 28 y 84 días. Este índice incluye 5 variables: edad, bilirrubina sérica, urea, tiempo de protrombina y conteo de leucocitos en sangre periférica. Tomando como valor de corte 9, este índice tiene alta sensibilidad y especificidad para predecir mortalidad a corto plazo [72]. Este índice parece ser mejor en predecir mortalidad a corto plazo que la FD de Maddrey, pero es

equivalente al índice de MELD [35]. En otro estudio recientemente publicado por este mismo grupo han encontrado que el índice de Glasgow además permite identificar a los pacientes con HA grave (FD de Maddrey ≥ 32) que parecen beneficiarse de tratamiento corticoideo. Pacientes con HA grave con un índice de Glasgow < 9 no tuvieron diferencias en la supervivencia independientemente si recibieron o no tratamiento corticosteroideo. En contraste, pacientes con HA grave y un índice de Glasgow ≥ 9 , los corticosteroides mejora la supervivencia [73].

En la Tabla 5 se muestra las fórmulas para el cálculo de los índices predictivos de mortalidad en pacientes con HA y en la Tabla 6 se muestra los estudios publicados en la literatura que han evaluado diferentes índices predictivos de mortalidad en pacientes con HA.

Tabla 5: Fórmulas para el cálculo de los diferentes índices predictivos de mortalidad en paciente con HA.

<u>Fórmulas de índices predictivos usados en HA</u>			
<i>FD de Maddrey</i>			
4.6 x tiempo de protrombina (seg) + bilirrubina sérica (mg/dl)			
<i>FD de Maddrey modificada</i>			
4.6 x [tiempo protrombina paciente-control (seg) + bilirrubina sérica (mg/dl)]			
<i>Índice de MELD</i>			
(9,57 x Ln Creatinina en mg/dl) + (3,78 x Ln Bilirrubina en mg/dl) + (11,20 x Ln INR) + 6,43.			
<i>Índice de Glasgow</i>			
	Puntuación		
	1	2	3
Edad (años)	< 50	≥ 50	—
Urea (mmol/L)	< 5	≥ 5	—
Leucocitos	< 15000	≥ 15000	—
Bilirrubina (mmol/L)	< 125	125-250	> 250
Tiempo de protrombina	$< 1,5$	1,5-2	> 2

Tabla 6: Índices predictivos de mortalidad en HA.

Autor/año	N	Diseño del estudio	Predicción mortalidad	FD de Maddrey S/E (%) VC	MELD S/E (%) VC	C-T-P S/E (%) VC	GAHS S/E (%) VC	Mortalidad (%)
Maddrey <i>et al.</i> 1989	66	Prospectivo	28 días	VC=32	—	—	—	65
Sheth <i>et al.</i> 2002	34	Retrospectivo	30 días	S=86/E=48 VC=32	S=86/E=82 VC=11	—	—	21
Kulkarni <i>et al.</i> 2004	125	Retrospectivo	28 días	S=66/E=62 VC=33	—	—	—	39
Dunn <i>et al.</i> 2005	73	Retrospectivo	30 y 90 días	S=88/E=65 VC=37	S=75/E=75 VC=21	—	—	21
Srijureja <i>et al.</i> 2005	202	Retrospectivo	Intrahospitalaria	S=83/E=84 VC=32	S=85/E=84 VC=18	S=76/E=80 VC=12	—	14,4
Forrest <i>et al.</i> 2005	241	Retrospectivo	28 días 84 días	S=82/E=39 S=79/E=40 32	S=96/E=27 S=95/E=31 VC=18/20		S=81/E=61 S=78/E=66 VC=9	23 32

VC= valor de corte, S= sensibilidad, E= especificidad, C-T-P= Clasificación de Child-Turcotte-Pugh, GAHS= índice de Glasgow.

En el estudio prospectivo publicado recientemente por Rincón *et al.* demostraron que pacientes con HA grave (FD de Maddrey ≥ 32) tienen un GPVH mayor que pacientes con cirrosis hepática alcohólica o de origen viral. En el análisis multivariado identificaron que el GPVH, el índice de MELD y la presencia de encefalopatía hepática son predictores independientes de mortalidad intrahospitalaria en pacientes con HA grave. Los valores de corte con mejor sensibilidad y especificidad pronóstica fueron 22 mmHG para el GVPH y 25 para el índice de MELD (Figura 10). Este aumento del GPVH puede ser consecuencia del incremento de la circulación hiperdinámica que ocurre en pacientes con HA y puede estar asociado por un lado con el aumento en la producción de citocinas inflamatorias como el TNF- α y por el otro con el aumento del volumen de hepatocitos ocasionado por la necrosis hepatocelular [57].

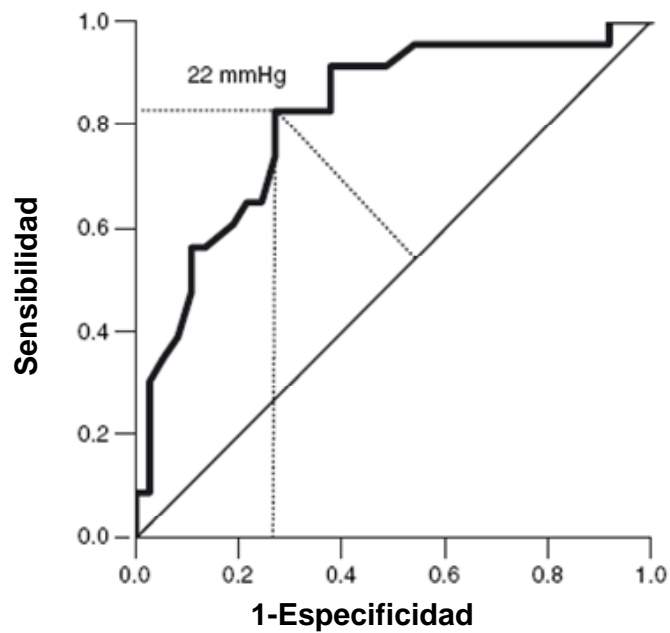


Figura 10: Análisis del área bajo la curva del gradiente de presión venosa portal (GPVH) en pacientes con HA grave. Extraído de Rincón *et al.* [57].

En los últimos años se han descrito otros marcadores predictivos de HA. Los niveles séricos de bilirrubina y de proteína C reactiva (PCR) son predictores independientes de HA en ausencia de infección y éste último se correlaciona con la FD de Maddrey. Citocinas inflamatorias como el TNF- α , IL-1 e IL-6 están implicadas en la síntesis hepática de PCR, un reactante de fase aguda. Valores séricos de PCR > 19 mg/L tiene una exactitud de 82% para el diagnóstico de HA [74]. Sin embargo, esta proteína también se eleva en procesos infecciosos que pueden estar presentes en pacientes con EHA y que por tanto no permitan una adecuada discriminación de la HA.

1.2.7. Tratamiento

El tratamiento de la HA depende de la gravedad de la enfermedad. Tradicionalmente se ha utilizado la FD de Maddrey para identificar las formas graves de la enfermedad (FD de Maddrey \geq 32), las cuales requieren tratamiento farmacológico debido a la elevada mortalidad en ausencia de tratamiento [75]. La abstinencia alcohólica es una estrategia clave en el tratamiento de la HA por su efecto positivo sobre las lesiones hepáticas [76]. Pacientes con formas leves de la enfermedad (FD de Maddrey < 32) se benefician de abstinencia alcohólica sostenida y soporte nutricional, sin requerir tratamiento farmacológico [34]. La mayoría de los pacientes con HA tienen algún grado de malnutrición asociada debido a la combinación de una escasa ingesta de nutrientes, disminución de la absorción intestinal y del depósito hepático de nutrientes [3]. La prevalencia de malnutrición en pacientes con HA se ha estimado que es casi del 100% en las formas graves y existe una estrecha correlación con mortalidad a corto y largo plazo [77]. Estos pacientes tienen un aumento de los requerimientos energéticos diarios por la misma enfermedad y por otro lado pueden tener una disminución de la ingesta por la presencia de anorexia, náuseas o vómitos asociado a la HA y al mayor aporte calórico proveniente del alcohol [78]. Existe muy poca información sobre los requerimientos

nutricionales de los pacientes con HA. Algunos estudios han demostrado que estos pacientes necesitan una ingesta diaria de 70-100 gr. de proteína para mantener un balance nitrogenado positivo. El resultado de varias investigaciones clínicas ha demostrado que la terapia nutricional enteral es beneficiosa en pacientes con EHA, debido a que mejora el estado nutricional de estos pacientes, pero es controvertido si mejora la supervivencia en pacientes con HA [77, 79, 80]. En el estudio de Cabré *et al.* realizado en 8 hospitales españoles, se comparó los efectos a corto y largo plazo de la nutrición enteral total o corticosteroides durante 28 días en 71 pacientes con HA grave (definida por FD de Maddrey > 32 o por la presencia de encefalopatía hepática espontánea). Este estudio no encontró diferencias en término de supervivencia entre ambos grupos de tratamiento planteando que futuros estudios deberían evaluar el valor de la combinación de ambas terapias en el tratamiento de la HA [80]. En relación con la terapia nutricional parenteral, existen varios ensayos clínicos con resultados difíciles de interpretar debido a que incluyen un pequeño número de pacientes principalmente con HA leve o moderada, algunos sin confirmación histológica y con grupo control que recibieron nutrición enteral o suplementos nutricionales orales [78]. De todo esto se desprende que los pacientes con HA requieren mejorar su estado nutricional y que la recomendación es dar un aporte mínimo de 30 Kcal/Kg y 1 gr. de proteína/Kg diariamente por vía oral o enteral preferiblemente, a menos que esta vía no sea posible, y en tal caso dar el aporte calórico por vía parenteral, eligiendo una vena periférica [78].

De todos los tratamientos disponibles para la HA, los corticosteroides han sido los fármacos más extensamente estudiados, aunque su eficacia es controvertida [61]. Cinco investigaciones clínicas aleatorizadas controladas con placebo han demostrado que los corticosteroides reducen la mortalidad en comparación con el placebo, mientras que otros 8 estudios clínicos no han demostrado diferencias [61]. Por otro lado, los resultados de los meta-análisis realizados al respecto también son controvertidos. El último meta-

análisis publicado en 2008 incluyó 15 investigaciones clínicas, de las que 12 tuvieron algún error de sesgo, con un total de 721 pacientes incluidos. Este estudio encontró que los corticosteroides no reducen la mortalidad en comparación con el placebo. Sin embargo, en el grupo de pacientes con HA grave (FD de Maddrey ≥ 32) y encefalopatía hepática, los corticosteroides mejoraron la supervivencia, pero estos estudios tenían una heterogeneidad significativa [81]. En base a esto, los autores concluyen que no existe suficiente evidencia para recomendar el uso de corticosteroides en cualquier subgrupo de pacientes con HA [81].

Estudios recientes han tratado de identificar en forma temprana a pacientes con HA grave que respondan a tratamiento corticosteroideo [82]. Mathurin *et al.* demostró que pacientes con HA grave (FD de Maddrey ≥ 32) tratados con corticosteroides con una disminución de los niveles séricos de bilirrubina al 7º día de tratamiento, tienen una supervivencia significativamente mayor que los pacientes sin mejoría en los niveles de bilirrubina al 7º día (82,8% vs. 23%, $p < 0,0001$, respectivamente). Pacientes con un cambio precoz en los niveles de bilirrubina a los 7 días de tratamiento son respondedores a tratamiento y por el contrario pacientes sin esta respuesta son no-respondedores a corticoides, probablemente estos últimos no se beneficien de continuar el tratamiento por más tiempo [83].

En 2007, este mismo grupo generó el modelo de Lille, un modelo predictivo de supervivencia en pacientes con HA grave (FD de Maddrey ≥ 32) tratados con corticosteroides. Este modelo es altamente predictivo de mortalidad a 6 meses e intenta mejorar el manejo de pacientes con HA grave. Pacientes con un índice $\geq 0,45$ tienen una probabilidad de muerte a los 6 meses de 75%. Este modelo incluye 5 parámetros al día 0 (antes de iniciar corticosteroides) y el cambio de la bilirrubina al día 7; la fórmula utilizada es: $[(3,19 - 0,101) \times \text{edad (años)}] + [0,147 \times \text{albúmina (gr/L) al día 0}] + [0,0165 \times$

(evolución de la bilirrubina en μM) - $[0.206 \times (\text{insuficiencia renal})] - 0,0065 \times (\text{bilirrubina al día 0 en } \mu\text{M}) - [0,0096 \times (\text{tiempo de protrombina en segundos})]$. Basado en este nuevo modelo, el término “no-respondedores a corticosteroides” no está restringido simplemente a la ausencia del cambio de la bilirrubina al séptimo día, como habían publicado previamente, sino que debe extenderse a todos los pacientes con un índice de Lille $\geq 0,45$ (Figura 11). Usando este valor de corte, el modelo es capaz de identificar a los pacientes con HA grave que no se benefician de tratamiento corticosteroideo (aproximadamente 40%), en comparación con el 25% que identifica sólo el cambio de la bilirrubina al 7º día [84].

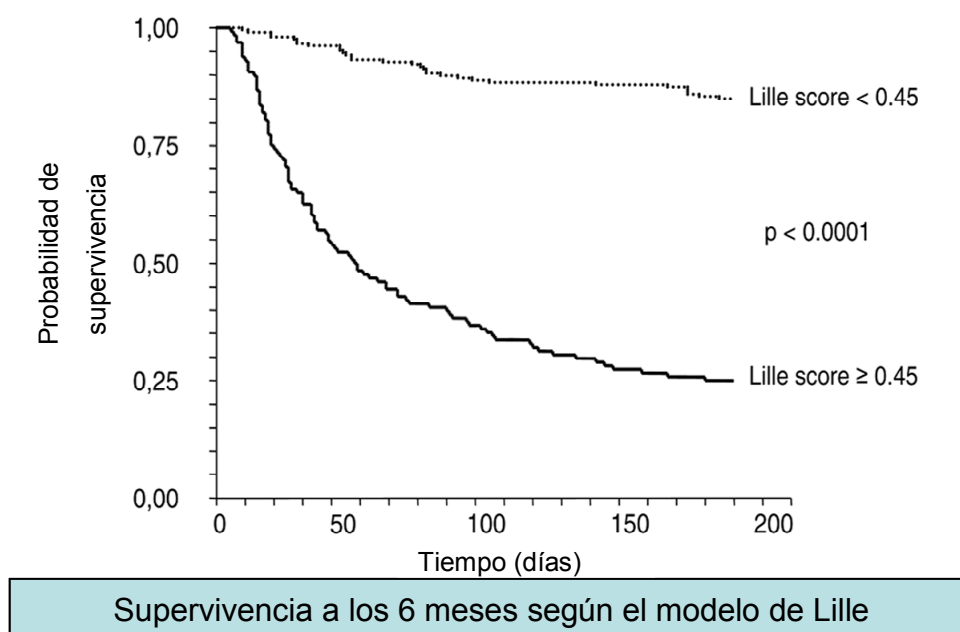


Figura 11: Curva de Kaplan-Meier según el valor de corte de 0,45 del modelo de Lille. Extraído de Louvet et al. [84]

Otro fármaco utilizado en el tratamiento de la HA es la pentoxifilina, que modula la transcripción del gen de $\text{TNF-}\alpha$, inhibiendo así la producción de esta citocina [3]. Akriyades *et al.* publicó un estudio clínico aleatorizado, controlado con placebo que comparó el tratamiento con pentoxifilina (400 mg, c/8 horas) durante 4 semanas en

pacientes con HA grave (FD de Maddrey ≥ 32). Este estudio demostró que la pentoxifilina mejora la supervivencia a corto plazo (28 días) de los pacientes con HA grave. Este beneficio parece estar relacionado con una disminución significativa del riesgo de desarrollar síndrome hepatorenal [85].

Pacientes no-respondedores a corticosteroides pueden beneficiarse de otras alternativas terapéuticas como la pentoxifilina u otros antioxidantes. En un estudio piloto publicado recientemente en pacientes con HA grave que no respondían a tratamiento corticoideo, basado en el cambio de la bilirrubina al 7º día, se reemplazó el tratamiento con corticosteroides por pentoxifilina hasta completar 4 semanas de tratamiento. Sin embargo, no hubo diferencias en la supervivencia de estos pacientes en comparación con controles históricos que continuaban tratamiento con corticosteroides [86].

Datos previos sugieren que el TNF podría jugar un papel en la patogenia de la HA, como indica que los niveles de TNF- α se encuentran elevados en pacientes con HA y que están asociados con supervivencia a largo plazo en estos pacientes [87, 88]. Estos resultados llevaron a evaluar el uso del infliximab, un anticuerpo monoclonal anti-TNF, en pacientes con HA. El infliximab se une con alta afinidad al TNF y bloquea sus efectos biológicos y ha sido utilizado en otras enfermedades como en la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide [2]. En el 2002, fue publicado un estudio piloto utilizando infliximab en el tratamiento de 20 pacientes con HA grave (FD de Maddrey ≥ 32). Los pacientes recibieron prednisona (40 mg/d) por 28 días e infliximab (5mg/Kg/d) o placebo en el día 0. Los pacientes que recibieron prednisona combinada con infliximab tuvieron buena tolerancia al tratamiento y mejoraron significativamente la FD de Maddrey en comparación con el grupo placebo [89]. Basado en este estudio, se realizó una investigación clínica aleatorizada controlada con placebo, utilizando infliximab 10 mg/Kg/d combinado con prednisolona (40mg/d por 28 días) e incluyó 36 pacientes con HA grave

(FD de Maddrey ≥ 32). Este estudio fue suspendido por la presencia de mayor mortalidad en el grupo tratado con infliximab (39%) en comparación con el grupo placebo (11%). Este incremento de la mortalidad estuvo asociado con el desarrollo de infecciones bacterianas graves [90].

Otro fármaco utilizado en el tratamiento de la HA es el etanercept, el cual es una proteína dimérica de fusión que se une al TNF bloqueando su interacción con los receptores de la superficie celular, inhibiendo así la señalización del TNF. En el 2004, fue publicado un estudio piloto donde 13 pacientes con HA moderada y grave (FD de Maddrey ≥ 15) fueron tratados con etanercept durante 2 semanas. La supervivencia a los 30 días de estos pacientes fue del 92%. El tratamiento fue interrumpido en el 23% de los pacientes por presencia de efectos adversos (infecciones, descompensación hepatorenal y sangrado gastrointestinal) [91]. Recientemente, ha sido publicado un estudio clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, en el que trataron durante 3 semanas a 48 pacientes con HA moderada o grave (MELD ≥ 15), 22 pacientes en el grupo placebo y 26 en el grupo etanercept. La mortalidad al mes fue similar en los dos grupos, pero la mortalidad a los 6 meses fue mayor en el grupo tratado con etanercept en comparación con el grupo placebo (57,7 vs. 22,7%; $p=0,017$). Este aumento de la mortalidad estuvo asociado a una mayor tasa de infecciones graves [92].

El estrés oxidativo es otra característica de la HA que puede inducir apoptosis, por lo que el uso de antioxidantes puede ser útil en el tratamiento de estos pacientes. Basados en esta premisa, varios estudios han sido publicados en los últimos años donde se evalúa el uso de antioxidantes en el tratamiento de la HA. Diversos antioxidantes como la N-acetilcisteína, combinaciones de vitaminas y oligoelementos (vitamina E, vitamina A, selenio, zinc, biotina, manganeso, cobre) entre otros, han sido utilizados. Sin embargo, estos estudios han fallado en demostrar que el tratamiento con antioxidantes

mejore la supervivencia de los pacientes con HA, por lo que no existe suficiente evidencia que justifique su uso en la actualidad [77, 80, 93-97].

El propiltiouracilo (PTU) es otro fármaco utilizado en el tratamiento de la EHA basado en las siguientes observaciones: 1) el consumo agudo y crónico de alcohol causa un estado hipermetabólico caracterizado por un incremento del gasto energético y del consumo de oxígeno hepático y 2) el daño hepático relacionado con el alcohol es más evidente en el área del acino hepático donde existe menor tensión de oxígeno (zona 3), entonces puede simular la isquemia relacionada a hipoxia relativa. El mecanismo putativo del PTU para producir algún beneficio en este marco es reducir el consumo de oxígeno por parte del hepatocito [3, 61]. Se han realizado varios ensayos clínicos utilizando PTU en pacientes con EHA, pero sólo dos en HA, obteniendo resultados controvertidos. En uno de ellos encontraron mejoría analítica, pero sin mejorar la supervivencia y en el segundo no encontraron ningún tipo de beneficio comparado con el placebo [98, 99]. El meta-análisis realizado evaluando el uso de PTU no mostró ningún beneficio en pacientes con EHA [100].

Otros fármacos utilizados en el tratamiento de la HA han sido los esteroides anabólicos. El motivo para utilizarlos proviene de estudios observacionales de hombres con EHA, quienes desarrollaron feminización y posteriormente múltiples anomalías endocrinas. Además, el uso de estas drogas en otras situaciones clínicas ha mostrado mejoría del estado nutricional. Existen 5 ensayos clínicos utilizando oxandrolona o testosterona en pacientes con HA y cirrosis. Sin embargo, los resultados son controvertidos y no existe un beneficio claro en mejorar la supervivencia de estos pacientes [61].

La colchicina un inhibidor de la síntesis de colágeno también se ha utilizado en el tratamiento de esta enfermedad. La colchicina tiene propiedades anti-inflamatorias, incluyendo la inhibición de la migración de leucocitos, movilización de los depósitos de ferritina hepáticos e inhibición de la producción de citocinas, inflamación y proliferación de fibroblastos. Dos ensayos clínicos han utilizado este fármaco en pacientes con HA, pero han fallado en demostrar beneficios reales [61, 101-103].

Recientemente se ha encontrado que los pacientes alcohólicos tienen disminuido los niveles de bifidobacterias, lactobacilos y enterococos a nivel intestinal. Los probióticos son microorganismos vivos que pueden tener efectos beneficiosos al aumentar los niveles de bifidobacterias y lactobacilos en la luz intestinal. En un estudio piloto reciente sobre el uso de probióticos en pacientes con EHA encontraron que el tratamiento con *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus plantarum* se asoció con una importante disminución de los niveles séricos de aminotransferasas y bilirrubina en comparación con el grupo control. Sin embargo, este estudio incluyó pacientes con HA sin confirmación histológica, con HA leve y no evaluó el impacto del tratamiento sobre la supervivencia [104].

Actualmente ha incrementado el uso de diálisis extracorpórea con albúmina en algunas enfermedades hepáticas. La albúmina dispone de un gran número de sitios de unión que tiene importantes funciones de transporte y detoxificación, por lo que se ha usado como dializador. La diálisis con albúmina utilizando el método MARS (Sistema de Recirculación Molecular Absorbente) se ha utilizado principalmente en el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda, especialmente en aquellos con enfermedad hepática crónica con insuficiencia hepática aguda superimpuesta. Este sistema ayuda a eliminar la bilirrubina, ácidos biliares, aminoácidos aromáticos, ácidos grasos de cadena mediana y citocinas [93, 105]. Un estudio utilizando MARS en el tratamiento de pacientes con HA

(n=8) demostró que mejora la función hepática y renal, la encefalopatía hepática, la hemodinamia cardíaca y la supervivencia a los 3 meses [106]. Sin embargo, en otro estudio publicado posteriormente encontraron que MARS mejoraba el GPVH de los pacientes con HA, pero asociado a una elevada mortalidad intrahospitalaria (75%) por fallo multiorgánico relacionado con sepsis [107]. Resultados recientes también sugieren que la diálisis con albúmina mejora la encefalopatía hepática en pacientes con HA grave [108]. En 2006, se publicó otro estudio que comparó placebo con el uso de diálisis con albúmina por 2 métodos: MARS y FPSA (separación, absorción y diálisis de plasma no fraccionado, sistema Prometheus). Ambos sistemas mejoran la función hepática de estos pacientes, pero MARS fue el único en atenuar la circulación hiperdinámica. En este estudio no se evaluó mortalidad e incluyeron sólo 18 pacientes, 6 en cada grupo de tratamiento [109]. Por tanto, en la actualidad no existe evidencia definitiva de los beneficios del uso de diálisis con albúmina para mejorar la supervivencia de los pacientes con HA.

El trasplante hepático está establecido como tratamiento de los pacientes con cirrosis descompensada o CHC [110]. Los pacientes con EHA tienen excelentes resultados tras el trasplante hepático comparable con otras causas de enfermedad hepática de estadio avanzado [93]. En 1988, Starzl *et al.* reportaron una serie de pacientes con EHA a quienes se les realizó trasplante ortotópico hepático (TOH) obteniendo una supervivencia aceptable [111]. Desde entonces, la EHA es la primera o segunda causa de trasplante hepático en USA y Europa [3]. Sin embargo, uno de los criterios para trasplante hepático es la abstinencia alcohólica por al menos 6 meses antes del trasplante, lo que indica que los pacientes con HA no pueden ser trasplantados. En un estudio publicado en 2002, evaluaron la influencia de la HA superimpuesta detectada en el explante, sobre el resultado del trasplante hepático en pacientes con cirrosis alcohólica. Estos hallazgos fueron comparados con los obtenidos en otro grupo

trasplantado por otra etiología de la enfermedad hepática y con pacientes trasplantados por cirrosis alcohólica sin HA en el explante hepático. No encontraron diferencias en término de supervivencia entre los 3 grupos y además la recidiva del alcoholismo no estuvo asociada a la presencia de HA en el explante [112]. Aproximadamente, el 20-50% de los pacientes que reciben un TOH por EHA reconocen alguna ingesta de alcohol durante los primeros 5 años posterior al trasplante, mientras que el 10-15% volverán a abusar del alcohol. Sin embargo, a pesar de los efectos nocivos del alcohol sobre el injerto y el receptor, la tasa de supervivencia a los 5 y 10 años del TOH es tan buena como en pacientes trasplantados por otra causa de enfermedad hepática [3]. No obstante, se desconoce el verdadero impacto de trasplantar pacientes con alcoholismo activo sobre la supervivencia del receptor y del injerto debido a la inexistencia de estudios prospectivos al respecto [113]. Debido a la baja disponibilidad de órganos para el trasplante se cuestiona si los pacientes con EHA, una enfermedad autoinfringida, deben ser sometidos a trasplante hepático y hasta el momento los programas de trasplante sólo contienen pacientes con abstinencia alcohólica mantenida por al menos 6 meses para ser incluidos en la lista de trasplante [3]. Al considerar la escasez de órganos para el trasplante es razonable que los pacientes con HA no sean trasplantados. Es probable que en el futuro cercano, los clínicos tengan que considerar el trasplante hepático como parte del manejo de pacientes cuidadosamente seleccionados. Por ello, surge la clara necesidad de tener buenos índices predictivos de mortalidad a corto plazo que identifiquen pacientes con elevado riesgo de muerte y que puedan ser utilizados para identificar pacientes que se beneficiarían de trasplante hepático como única opción terapéutica y que puedan formar parte de futuros estudios pilotos [113].



Cadaqués, 2005

JUSTIFICACIÓN

La presente tesis tiene las siguientes justificaciones:

1- No existen estudios que evalúen el valor combinado de parámetros clínicos, analíticos, histológicos y hemodinámicos hepáticos en el pronóstico de los pacientes con HA. Asimismo, los estudios existentes no permiten una estratificación pronóstica en varios grupos. Por tanto, existe una clara necesidad de identificar parámetros predictivos de supervivencia en la HA que permitan una exacta estratificación pronóstica de estos pacientes con la finalidad de tomar decisiones terapéuticas que puedan mejorar el pronóstico a corto y mediano plazo.

2- La patogenia de la HA es poco conocida, lo que dificulta el desarrollo de nuevas terapias. En particular, existen pocos datos obtenidos en pacientes que identifiquen los mecanismos implicados en la fisiopatología de esta enfermedad que puedan servir como dianas terapéuticas. La mayoría de los estudios sobre mecanismos patogénicos provienen de estudios experimentales, que no reflejan adecuadamente lo que ocurre en los pacientes con HA. Por tal motivo, se investigó la expresión de los componentes de la familia de la interleucina 8 (quimiocinas CXC) en una amplia serie de pacientes con HA, así como su impacto sobre el pronóstico y la gravedad de la enfermedad.



Viladrau, 2007

OBJETIVOS

Objetivos Generales:

1- Evaluar el valor combinado de parámetros epidemiológicos, clínicos, analíticos, histológicos y hemodinámicos en pacientes con HA confirmada histológicamente para generar un nuevo sistema predictivo capaz de estratificar el riesgo de muerte a 90 días y al año (Estudio 1).

2- Investigar el papel patogénico de las quimiocinas CXC en la HA evaluando el impacto sobre la gravedad y la supervivencia a corto y mediano plazo (Estudio 2).

Objetivos Específicos:

Estudio 1:

1- Identificar factores predictivos de mortalidad en pacientes con HA, incluyendo parámetros epidemiológicos, clínicos, analíticos, histológicos y hemodinámicos.

2- Generar un nuevo índice predictivo de mortalidad en pacientes con HA que permita una estratificación pronóstica a corto y mediano plazo.

Estudio 2:

1- Evaluar la expresión génica hepática de quimiocinas CXC y su asociación con el pronóstico y la gravedad de la HA.

Objetivos

2- Evaluar el impacto de la apoptosis hepatocelular, el grado de inflamación por neutrófilos y/o linfocitos y la expresión hepática de algunas quimiocinas CXC sobre el pronóstico de los pacientes con HA.



Laboratorio 503, 2007

RESULTADOS

ESTUDIO 1: Un Nuevo Sistema de Puntuación para la Estratificación Pronóstica de los pacientes con Hepatitis Alcohólica (Am J Gastroenterol 2008;103:2747-2756).

La HA forma parte del espectro de la EHA y puede desarrollarse en aproximadamente 35% de los alcohólicos. La forma grave de la enfermedad se asocia a una elevada mortalidad a corto plazo. En la actualidad existe una clara necesidad de desarrollar nuevas terapias para pacientes con HA grave debido a que los tratamientos habituales como los corticosteroides y antioxidantes no son totalmente efectivos.

Existen varios sistemas predictivos de supervivencia en pacientes con HA, pero estos no permiten una correcta estratificación pronóstica. La FD de Maddrey descrita en la década de los 70, ha sido el índice más ampliamente utilizado para evaluar el pronóstico de estos pacientes. Este índice discrimina entre formas graves y no graves de la enfermedad, pero estudios recientes han demostrado que otros índices como el MELD también tienen capacidad predictiva de estos pacientes. Sin embargo, la mayoría de estos estudios incluyen pacientes en forma retrospectiva, sin confirmación histológica y no incluyen en el análisis parámetros hemodinámicos o histológicos.

En este estudio se evaluó el valor combinado de parámetros clínicos, analíticos, histológicos y hemodinámicos en pacientes con HA confirmada histológicamente para generar un nuevo sistema de puntuación capaz de estratificar a los pacientes de acuerdo al riesgo de muerte a 90 días y al año. La exactitud pronóstica de este nuevo sistema fue confirmado en otra cohorte independiente de pacientes con HA.

Resultados principales

1- Identificación de factores asociados con mortalidad a 90 días:

Generación del Índice ABIC

Se incluyó 103 pacientes con HA confirmada histológicamente en la cohorte de estudio.

- El análisis univariado identificó 8 variables asociadas con mortalidad a 90 días: edad, FD de Maddrey, índice de MELD, índice de Glasgow, creatinina sérica, bilirrubina sérica, INR y GPVH (Tabla 2 del manuscrito).
- El análisis multivariado por regresión de Cox identificó 5 predictores independientes de mortalidad a 90 días: edad, bilirrubina sérica, creatinina sérica e INR al ingreso y el desarrollo de insuficiencia renal intrahospitalaria (Tabla 3 del manuscrito).
- Usando las variables al ingreso (edad, INR, bilirrubina y creatinina séricas) se generó un nuevo índice (ABIC) a partir de la suma de los logaritmos naturales de la HR (*Hazard ratio*) multiplicado por cada variable: (edad en años x ln 1,11) + (bilirrubina en mg/dl x ln 1,08) + (creatinina en mg/dl x ln 1,31) + (INR x ln 2,13). El índice resultante es: (edad x 0,1) + (bilirrubina x 0,08) + (creatinina x 0,3) + (INR x 0,8).
- La exactitud predictiva de mortalidad a 90 días del índice ABIC fue de 0,82 (p=0,0001) (Figura 1B del manuscrito). Usando valores de corte de 6,71 y 9,0 (puntos de corte con mejor sensibilidad y especificidad) se pudo identificar pacientes con bajo, intermedio y alto riesgo de muerte a 90 días.

- El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier demostró que pacientes con un índice ABIC $< 6,71$ tenían un bajo riesgo de muerte a 90 días (100% supervivencia), pacientes con índice de $6,71$ a $8,99$ tenían riesgo intermedio (70% de supervivencia) y pacientes con índice ≥ 9 tenían alto riesgo de muerte a 90 días (25% de supervivencia). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) (Figura 2A del manuscrito).
- La exactitud pronóstica del índice ABIC para predecir mortalidad a 90 días fue mejor que los otros índices: índice de MELD, FD de Maddrey o el índice de Glasgow. En nuestra serie, 17 pacientes con una FD de Maddrey ≥ 32 tenían un índice ABIC $< 6,71$ y 7 pacientes con HA no grave (FD de Maddrey < 32) tenían un índice ABIC $> 6,71$, de estos pacientes un tercio fallecieron a los 90 días.
- Retrospectivamente se evaluó la respuesta al tratamiento corticoideo según el índice ABIC. Pacientes con un riesgo bajo, intermedio y alto de muerte a 90 días tuvieron una respuesta al tratamiento de 100, 71 y 33%, respectivamente. El análisis multivariado demostró que el índice ABIC es el único predictor independiente de respuesta a corticosteroides comparado con el modelo de Lille, el índice de MELD, el índice de Glasgow y la FD de Maddrey.
- El índice ABIC calculado con parámetros a los 7 días de ingreso hospitalario también demostró una excelente capacidad pronóstica para predecir mortalidad a 90 días (área bajo la curva = 0,85). Al comparar este índice con el modelo de Lille en pacientes tratados con corticosteroides encontramos que tenía una mejor exactitud diagnóstica (0,84 vs 0,62, $p = 0,00002$).

2-Validación del índice ABIC en una cohorte confirmatoria

El índice ABIC fue validado en una cohorte independiente de 80 pacientes con HA confirmada histológicamente con características demográficas, analíticas y clínicas similares a la cohorte de estudio.

- El área bajo la curva para predecir mortalidad a 90 días para el índice ABIC fue de 0,81 similar al área bajo la curva de los otros índices (MELD, Glasgow y Maddrey). Sin embargo, el análisis multivariado demostró que este índice es el mejor predictor independiente de mortalidad a 90 días (HR=1,46; p=0,01).
- Se confirmó que los valores de corte 6,71 y 9 estratifica exactamente a los pacientes con riesgo de muerte a 90 días. Pacientes con índice ABIC < 6,71 tenían bajo riesgo de muerte (100% de supervivencia), pacientes con un índice ABIC de 6,71 a 8,99 tenían riesgo intermedio (67,5 % de supervivencia) y pacientes con un índice ABIC \geq 9 tenían alto riesgo de muerte (27,5% de supervivencia) (Figura 4 del manuscrito).

3-Utilidad del índice ABIC para predecir mortalidad al año

Se evaluó los factores pronósticos de mortalidad al año y la capacidad predictiva del índice ABIC para estratificar el riesgo de muerte al año del episodio de HA.

- El análisis multivariado evaluó todos los índices predictivos incluyendo el ABIC, MELD, Maddrey y Glasgow y demostró que el índice ABIC es el único predictor independiente de mortalidad al año (HR: 2,49; p=0,0001).

- La exactitud pronóstica del índice ABIC fue superior a la de los otros índices (área bajo la curva de 0,82 en comparación con 0,68 de la FD de Maddrey y 0,76 del índice de MELD y de Glasgow).
- Los valores de corte de 6,71 y 9 del índice ABIC igualmente permitió la estratificación pronóstica al año de estos pacientes. Pacientes con bajo riesgo ($< 6,71$) tenían una supervivencia de 97,1%, pacientes con riesgo intermedio (6,71-8,99) tenían una supervivencia de 64,3% y pacientes con riesgo alto (≥ 9) tenían una supervivencia de 33,33% al año.

A New Scoring System for Prognostic Stratification of Patients With Alcoholic Hepatitis

Marlene Dominguez, M.D.,^{1,4} Diego Rincón, M.D.,^{2,4} Juan G. Abraldes, M.D.,^{1,4} Rosa Miquel, M.D.,^{3,4} Jordi Colmenero, M.D.,^{1,4} Pablo Bellot, M.D.,^{1,4} Joan-Carles García-Pagán, M.D.,^{1,4} Rosamelia Fernández, M.D.,¹ Montserrat Moreno, B.Sc.,^{1,4} Rafael Bañares, M.D.,^{2,4} Vicente Arroyo, M.D.,^{1,4} Joan Caballería, M.D.,^{1,4} Pere Ginès, M.D.,^{1,4} and Ramón Bataller, M.D.^{1,4}

¹Liver Unit, Institut Clínic Malalties Digestives i Metabòliques; ³Pathology Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and Centro de Investigación Biomédica Esther Koplowitz (CIBEK), Barcelona, Catalonia, Spain; ²Liver Unit, Gastroenterology and Hepatology Division, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain and ⁴CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain

- OBJECTIVES:** Prognostic stratification of patients with alcoholic hepatitis (AH) may improve the clinical management and facilitate clinical trials. We aimed at developing a scoring system capable of providing prognostic stratification of patients with AH.
- METHODS:** Patients with biopsy-proven AH were prospectively included between 2000 and 2006. The biochemical, clinical, portal hemodynamic and histological parameters were evaluated. A Cox regression model was used for univariate and multivariate analyses. A predictive score was built using variables obtained at admission identified in the multivariate analysis. The resulting score was validated in an independent prospective cohort.
- RESULTS:** In total, 103 patients with biopsy-proven AH were included in the study cohort. Age, serum bilirubin, serum creatinine, and international normalized ratio (INR) independently predicted 90-day mortality. We generated the Age, serum Bilirubin, INR, and serum Creatinine (ABIC) score: $(\text{age} \times 0.1) + (\text{serum bilirubin} \times 0.08) + (\text{serum creatinine} \times 0.3) + (\text{INR} \times 0.8)$. The area under the curve (AUC) was 0.82. Using the Kaplan-Meier analysis with the cutoff values of 6.71 and 9.0, we identified patients with low, intermediate, and high risk of death at 90 days (100%, 70%, and 25% of survival rate, respectively). Using the same cutoff values, the ABIC score also stratified patients according to their risk of death at 1 yr. These results were validated by a confirmatory cohort (N = 80).
- CONCLUSIONS:** The ABIC score is a new tool that allows the stratification of risk of death in patients with AH at 90 days and 1 yr. This score can help improve the management of these patients and also help to perform clinical trials.

(Am J Gastroenterol 2008;103:2747–2756)

INTRODUCTION

Alcoholic liver disease (ALD) is a major cause of end-stage liver disease worldwide (1). It ranges from fatty liver, steatohepatitis, and liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma (2, 3). In addition, alcoholic hepatitis (AH) develops in up to 35% of heavy drinkers (4). In its severe forms, AH is associated with a high short-term mortality (5–8). It is characterized by steatosis, severe hepatocellular damage, inflammatory infiltrate, and pericellular fibrosis (9, 10). The presence of an AH can be suspected based on clinical and analytical data, yet a definitive diagnosis needs histological confirmation. Due to clotting deficiency, a liver biopsy is commonly performed using a transjugular approach (11).

There is a clear need to develop new therapies for patients with severe forms of AH. Classical therapies, which include corticosteroids and antioxidants, are not fully effective (12–16). Other approaches, such as tumor necrosis factor (TNF)- α blockade, are associated with an increased susceptibility to severe bacterial infections (17). We recently identified new inflammatory mediators such as Gro- α as potential mediators of this disease (18). Agents that inhibit this and other inflammatory chemokines are potential candidate drugs for these patients. To test new biological drugs, it is advisable to develop a scoring system that stratifies patients with AH according to their risk of death.

There are several scoring systems predicting survival in patients with AH, yet no studies have stratified patients with AH as having good, intermediate, or poor prognosis (11).

Traditionally, the prognosis of patients with AH has been assessed using Maddrey's discriminant function (DF) (11, 19, 20). By using this score, patients have been classified into severe and nonsevere AH. Other studies have demonstrated that the model for end-stage liver disease (MELD) score, the Glasgow alcoholic hepatitis score (GAHS), and the hepatic venous pressure gradient (HVPG) are better predictors of survival than Maddrey's DF in patients with AH (5, 11, 21–26). More recently, the Lille model, which contains six variables, has been shown to identify patients who do not respond to corticosteroids therapy, with an increased risk of death at 6 months (27).

Some of the abovementioned studies include patients without histological confirmation of AH, do not include histological and/or hemodynamic parameters, and only classify patients into severe and nonsevere AH. Therefore, we evaluated the combined value of clinical, analytical, histological, and hemodynamic parameters in patients with biopsy-proven AH to generate a new scoring system capable of stratifying patients according to their risk of death at 90 days and 1 yr. The prognostic accuracy of this new score was confirmed in other independent group of patients with AH.

METHODS

Patients in Study Cohort

We prospectively identified 144 patients admitted to the Liver Unit (Hospital Clínic, Barcelona, Spain) between January 2000 and March 2006, with clinically suspected AH. The inclusion criteria were: excessive alcohol consumption (>60 g/day) prior to admission, moderately elevated aminotransferases aspartate aminotransferase [AST] > alanine aminotransferase [ALT], high γ -glutamyl transpeptidase (GGT) and bilirubin serum levels, and a histological diagnosis of AH characterized by the presence of hepatocellular damage (hepatocellular ballooning and presence of Mallory bodies), inflammatory infiltrate (predominantly polymorphonuclear cells), and pericellular fibrosis. Patients with hepatocellular carcinoma or any other potential cause of liver disease were excluded from the study. Twenty-nine patients did not meet all inclusion criteria (15 did not meet the histological criteria for AH, 1 had drug-induced hepatotoxicity, 8 had concomitant HCV (hepatitis C virus) infection, 3 had concomitant HCV/HIV co-infection, 1 had hemochromatosis, and 1 had miliary tuberculosis). Twelve patients did not undergo liver biopsy and were excluded from the study (7 patients died during the first 48 h of admission and 5 patients did not give informed consent for the study). Finally, 103 patients with biopsy-proven AH were included in the analysis (study cohort). A liver biopsy was obtained percutaneously in 9 patients, and using a transjugular approach in 94, patients due to coagulation disorders (platelet count <50,000 and/or prothrombin time index <50%). All patients received nutritional support as well as psychological support for achieving alcohol abstinence. The patients were carefully evaluated and followed up by a multidisciplinary team composed of

a psychiatrist, a psychologist, and a social worker. During hospitalization and after hospital discharge, the patients were evaluated and followed up by a psychiatrist who is an alcohol and drug dependence specialist. We assessed the parameters including family support, patient awareness of alcohol dependency, cognitive deficits, and the presence/absence of an underlying psychiatric disease. The patients were visited at an outpatient clinic every 4 wk during the follow-up period, and ethanol was measured in the urine weekly. Alcohol abstinence was evaluated on the basis of patient's self-evaluation, family member interview, and determination of the alcohol content in the urine. The patients with sustained alcohol abstinence were defined as those without evidence of alcohol drinking for at least 6 months after the initial episode of AH.

Patients with severe AH, defined as fulfilling the histological criteria of AH plus a Maddrey's DF ≥ 32 at admission, were treated with 40 mg/day prednisone for 4 wk followed by a 2-wk taper, unless they had any contraindication (severe bacterial infection or diabetes mellitus with poor metabolic control) to corticosteroid treatment. The study was approved by the ethics committee of the Hospital Clínic, and all patients gave written informed consent.

Histological Analysis and Hepatic Hemodynamic Measurements

The liver specimens were formalin-fixed and paraffin-embedded, and slides of 3 μ m were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome. The biopsies were blindly assessed by the same pathologist (RM). A histological analysis was performed as follows: (a) degree of hepatocellular damage/ballooning (0 = none, 1 = mild and moderate, 2 = severe) and the presence of Mallory bodies, megamitochondria, and cholestasis (0 = no, 1 = yes); (b) degree of lymphocytic infiltration (0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe); (c) degree of polymorphonuclear infiltration (0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe); (d) degree of steatosis (0 = <10%, 1 = 10–33%, 2 = 33–66%, 3 = >66%); (e) steatosis distribution (0 = focal, 1 = diffuse); (f) lobular fibrosis (0 = none, 1 = zone 3 predominantly, 2 = fibrosis in zones 2 and 3, 3 = pan-lobular fibrosis); and (g) fibrosis stage (0 = no fibrosis, 1 = portal fibrosis, 2 = portal fibrosis and few septa, 3 = septal fibrosis without cirrhosis, 4 = cirrhosis). A hepatic hemodynamic assessment was performed within 48 h of admission in 94 patients (91%). The portal pressure was estimated on the HVPG, as described in detail previously (28).

Data Collection

The following data were collected for all patients: age, sex, history of alcohol consumption, clinical complications at admission and during hospitalization (after 48 h of admission): ascites, hepatic encephalopathy, renal failure (as defined as serum creatinine ≥ 1.5 mg/dL), bacterial infections and gastrointestinal bleeding; length of hospital stay, treatment received, cause of death, readmissions for AH, and admission in intensive care units. The analytical parameters at admission or

within 48 h of admission included serum glucose, cholesterol, triglycerides, sodium, albumin, aminotransferases, bilirubin and creatinine levels, blood urea nitrogen (BUN), international normalized ratio (INR), leukocyte count, neutrophil count, platelet count, and hematocrit. The histological findings (fibrosis stage, degree of steatosis, degree of hepatocellular damage and ballooning, degree of inflammatory infiltrate, and cholestasis) and degree of portal hypertension (HPVG) were also recorded. The MELD, modified Maddrey's DF, and Glasgow scores were calculated based on the laboratory values within 48 h of admission. The mortality was evaluated at 90 days and 1 yr.

Statistical Analysis

All demographic, clinical, analytical, histological, and hemodynamic data were included in the univariate analysis. The Cox regression univariate model was used to identify variables that were associated with 90-day and 1-yr mortality. The variables that were statistically significant in the univariate model were entered into a backward stepwise elimination variable selection procedure (multivariate Cox regression) in a hierarchized manner to avoid overfitting. The criterion for retaining predictors was a *P* value of less than 0.10. Thus, the variables that were independently associated with 90-day mortality were used to generate a new score. This score was calculated from the sum of each natural logarithm (ln) of hazard ratio (HR) multiplied by each variable identified, that is, $(\ln \text{HR} \times \text{variable 1}) + (\ln \text{HR} \times \text{variable 2})$. The output provides the 95% confidence intervals (CIs) along with standard error. The cutoff point with best sensitivity and specificity of the new score was determined through the receiver-operating characteristic curve (ROC) coordinate. Survival curves by the Kaplan-Meier method were created and compared using the log-rank test. The accuracy to predict short-term and long-term survival of the new score was compared with the MELD score, the modified Maddrey's DF, and the Glasgow score through the analysis of the area under the curve (AUC). A statistical analysis was performed using the SPSS version 12.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL), except that the comparison between ROC curves (concordance [c] statistic test) was performed by the method of Hanley and McNeil using the MedCalc version 9.3.0.0. (Medisoftware, Mariakerke, Belgium).

Confirmation of the New Score

The new score was confirmed in an independent prospective cohort of 80 patients with biopsy-proven AH (70 patients admitted consecutively to the Liver Unit of Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain, between 2000 and 2004, and 10 patients admitted consecutively to the Liver Unit of our institution between April 2006 and February 2007). All patients met the same inclusion criteria mentioned above for the study cohort. Consequently, all patients from the confirmatory group were treated with corticosteroids based on Maddrey's DF.

RESULTS

Patient Characteristics

The demographic, clinical, analytical, hemodynamic, and histological variables of the study cohort are shown in Table 1. Ninety patients (87.3%) developed at least one major complication during hospitalization, including ascites, bacterial infection, renal failure, encephalopathy, or gastrointestinal bleeding. The overall 90-day and 1-yr mortality rate was 20% and 26%, respectively (Fig. 1A). The main causes of death both at 90 days and 1 yr were sepsis (29%) and liver failure (52%). Three patients received a liver transplant within 2 yr after the initial episode of AH. Sustained alcohol abstinence was reached in 55 patients (53%), and 10 patients (9.7%) presented an additional episode of AH during the follow-up. In the univariate analysis, we found that alcohol abstinence did not impact patient survival (*P* = 0.26).

Factors Associated With 90-Day Mortality: Generation of the Age, serum Bilirubin, INR, and serum Creatinine (ABIC) Score

The univariate analysis identified eight variables at admission that were significantly associated with 90-day mortality (Table 2). The variables that reached a *P* value <0.05 in the univariate analysis were introduced into a multivariate stepwise Cox regression in a hierarchized manner followed by a backward elimination procedure. Age (*P* = 0.001), serum bilirubin level (*P* = 0.038), INR (*P* = 0.05), serum creatinine level (*P* = 0.015), and in-hospital renal failure (*P* = 0.001) independently predicted 90-day mortality (Table 3). Of note, the histological parameters did not influence the prognosis in these patients. Using the variables available at admission (Age, serum Bilirubin, INR and serum Creatinine), a new score (ABIC score) was generated from the sum of natural logarithms (ln) of HR multiplied by each variable [$(\text{age in years} \times \ln 1.11) + (\text{bilirubin in mg/dL} \times \ln 1.08) + (\text{creatinine in mg/dL} \times \ln 1.31) + (\text{INR} \times \ln 2.13)$]. The resulting score was: $[(\text{age} \times 0.1) + (\text{serum bilirubin} \times 0.08) + (\text{serum creatinine} \times 0.3) + (\text{INR} \times 0.8)]$. The values obtained ranged from 4.9 to 12.26. The AUC of the ABIC score was 0.82 (95% CI 0.73–0.91, *P* = 0.0001) (Fig. 1B). Using a cutoff value of 6.71 and 9.0 (optimal cut points with better sensitivity and specificity), this score identified patients with AH that have low, intermediate, and high risk of death at 90 days. Thirty-five patients (34%) had an ABIC score <6.71, 56 (54.3%) had a score between 6.71 and 8.99, and 12 patients (11.7%) had a score ≥ 9.0 . The sensitivity and specificity for prediction of the 90-day survival for a cutoff of 6.71 were 100% and 50%, respectively, and for a cutoff of 9.0, were 70% (sensitivity) and 33% (specificity). A Kaplan-Meier survival analysis was performed to compare 90-day mortality in patients with an ABIC score value lower than 6.71, between 6.71 and 8.99, and greater than 9.0. As shown in Figure 2A, these cutoff values strongly discriminate patients with low risk (100% survival), intermediate risk (70% survival), and high risk (25%

Table 1. Demographic, Clinical, Analytical, Histological, and Hemodynamic Characteristics of Patients Included in the Study and Confirmatory Cohorts

	Median or Percentage (95% Confidence Interval)		P Value
	Study Cohort (N = 103)	Confirmatory Cohort (N = 80)	
Age (yr)	49 (35–65)	45 (29–67)	NS
Male (%)	69	46	NS
Alcohol intake (g/day)	100 (60–200)	100 (65–180)	NS
Severe AH (%)*	75	86	NS
Hospitalization (days)	15 (6–39)	15 (6–90)	NS
Follow-up (months)	17 (0.3–67.2)	11 (0.27–60.00)	NS
In-hospital mortality (%)	14	22	NS
90-day mortality (%)	20	42.5	0.001
1-yr mortality (%)	26.2	42.5	0.001
At admission			
BUN (mg/dL)	10 (4.7–78)	15 (4–82)	NS
Creatinine (mg/dL)	0.8 (0.4–3.1)	0.8 (0.4–2.2)	NS
Bilirubin (mg/dL)	9.5 (1.3–29)	20 (3.14–36)	NS
Platelets count ($\times 10^9$)	132 (34–334)	120 (30–280)	NS
Leukocytes count ($\times 10^9$ /L)	9.3 (2.8–22.14)	12.7 (4–26.9)	NS
International normalized ratio	1.7 (1.09–2.7)	2.09 (1.1–4.01)	0.001
AST (U/L)	125 (46–319)	115 (52–200)	NS
ALT (U/L)	51 (17–167)	55 (10–150)	NS
GGT (U/L)	325 (46–2158)	300 (50–150)	NS
Maddrey's DF	50 (10–113)	52 (21–101)	NS
MELD score	22 (11–39)	26 (18–40)	NS
Glasgow score	8 (5–10)	9 (6–12)	NS
HVPG (mmHg)**	20 (10–28)	22 (15–25)	NS
Cirrhosis (%)	60	71	NS
During hospitalization			
Infections (%)	48.5	19	NS
Ascites (%)	75.7	84	NS
Hepatic encephalopathy (%)	33	48	NS
Gastrointestinal bleeding (%)	18.5	10	NS
Renal failure (%)	25.2	13	NS
Corticosteroids therapy (%)	46	78	NS

*Severe alcoholic hepatitis is defined as those patients with a Maddrey's DF ≥ 32 .

**Hepatic venous pressure gradient.

survival) of death, with these differences being statistically significant ($P < 0.0001$).

As expected, patients with high risk of death (ABIC score ≥ 9.0) had a higher rate of major clinical complications (100% of patients) than patients with moderate and low risk of death (76% and 60% of patients, respectively). These complications include hepatic encephalopathy ($P < 0.0001$), acute renal failure ($P = 0.07$), and severe bacterial infections ($P = 0.004$). In this subset of patients, sepsis was the main cause of death.

We next compared the accuracy of the ABIC score with the MELD, Maddrey's DF, and the Glasgow scores in predicting 90-day mortality (Fig. 2B). The c-statistic values were: 0.70 (95% CI 0.56–0.84, $P = 0.008$) for Maddrey's DF, 0.76 (95% CI 0.64–0.88, $P = 0.0004$) for the MELD score, and 0.75 (95% CI 0.63–0.86, $P = 0.001$) for the Glasgow score. These values were lower than the c-statistic value of the ABIC score (0.82, $P = 0.045$ vs Maddrey's DF). Importantly, when including all predictive scores in a multivariate analysis, the ABIC score was the best independent predictor of 90-day mortality (HR 2.78, 95% CI 1.90–4.09, $P = 0.0001$). In our series, we identified 17 patients with a Maddrey's DF > 32 but with an ABIC score < 6.71 . More-

over, 7 patients had a Maddrey's DF < 32 and an ABIC score > 6.71 . One-third of these latter patients died after 90 days.

Furthermore, we retrospectively evaluated the response to corticosteroids in the group of patients at high risk of death. When including only patients treated with corticosteroids, we found that the response to therapy was 100%, 71%, and 33% in patients with low, intermediate, and high risk of death, respectively ($P < 0.038$). Moreover, the multivariate analysis demonstrated that the ABIC score is only an independent predictor of response to treatment when including the Lille model, the MELD score, the Glasgow score, and Maddrey's DF (HR 2.29, 95% CI 1.51–3.79, $P = 0.004$). Next, we compared our scoring system with other scores that are commonly obtained at admission (MELD and Glasgow scores) and found that the MELD score does not allow the identification of patients who respond to therapy (68% vs 60% of response on patients with a MELD score lower and greater than 20, respectively, $P = 0.86$). Similar results were obtained using the Glasgow score (75% vs 63% of response on patients with a Glasgow score lower and greater than 8, respectively, $P = 0.41$).

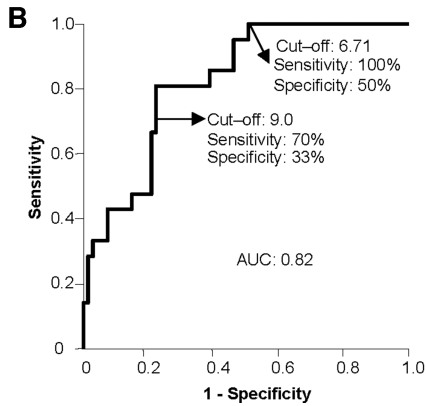
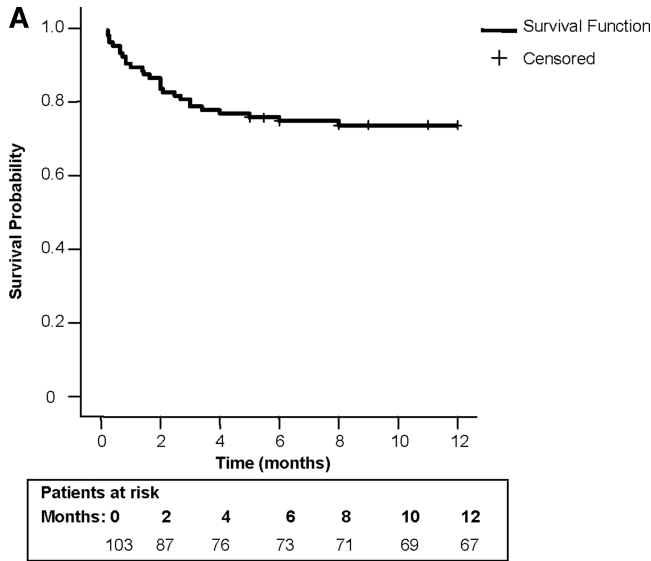


Figure 1. (A). Kaplan-Meier curve showing 1-yr survival in the study cohort. (B). Receiver-operating characteristic curve (ROC) for 90-day survival using the ABIC score in the study cohort. A cutoff of 6.71 and 9.0 was chosen to identify patients with low, intermediate, and high risk of death.

We finally studied whether the ABIC score is also useful when calculating the data obtained 7 days after admission. We found that the AUC of our score for predicting 90-day mortality is 0.85 (95% CI 0.75–0.94, $P < 0.0001$). The cutoff values used to define patients with high, intermediate, and low risk of death described here also were applied when the ABIC score was obtained 7 days after admission (Fig. 3). We compared the ABIC score at 7 days with the Lille model in patients treated with corticosteroids. Our scoring system had a better diagnostic accuracy than the Lille model (AUC 0.84 vs 0.62, $P = 0.0002$) in predicting mortality at 6 months.

Performance of the ABIC Score in the Confirmatory Cohort

Our score was also assessed in an independent confirmatory cohort of 80 patients with biopsy-proven AH. Most demographic, analytical, and clinical parameters were similar in both confirmatory and study cohorts (Table 1). The AUC for predicting 90-day survival was 0.81 for the ABIC score

Table 2. Factors Associated With 90-Day Mortality in Univariate Analysis in the Study Cohort

Variable	Univariate Cox Regression		
	Hazard Ratio	95% CI	P Value
At admission			
Age	1.06	1.01–1.12	0.015
Maddrey’s DF	1.01	1.00–1.02	0.0007
MELD score	1.14	1.08–1.20	0.0006
Glasgow score	1.86	1.35–2.54	0.0001
Serum creatinine	1.51	1.26–1.81	0.0009
Serum bilirubin	1.09	1.04–1.14	0.0007
INR	2.16	1.15–4.06	0.016
HPVG	1.07	1.00–1.14	0.05
During hospitalization			
Infections	3.3	1.33–8.19	0.01
Hepatic encephalopathy	2.62	1.05–6.50	0.038
Renal failure	4.8	1.98–11.66	0.001

(95% CI 0.7–0.91, $P < 0.001$), 0.80 for Maddrey’s DF (95% CI 0.70–0.90, $P < 0.001$), 0.80 for the MELD score (95% CI 0.70–0.91, $P < 0.001$), and 0.81 for the Glasgow score (95% CI 0.71–0.92, $P < 0.001$). Similar results were obtained at 1 yr (data not shown). The multivariate analysis including all scores demonstrated that the ABIC score was the better independent predictor of 90-day mortality in this group of patients (HR 1.46, 95% CI 1.11–1.93, $P = 0.01$). All patients with an ABIC score < 6.71 ($N = 11$) were alive at 90 days. Moreover, patients with an ABIC score between 6.71 and 8.99 ($N = 40$) had a 90-day survival rate of 67.5%, and those patients with an ABIC score ≥ 9 ($N = 29$) had a 90-day survival rate of 27.5%. The Kaplan-Meier analysis confirmed that the cutoff values of 6.71 and 9.0 accurately stratify patients with low, intermediate, and high risk of death at 90 days ($P < 0.0001$) (Fig. 4). In the confirmatory cohort, the percentage of patients treated with corticosteroids was higher than in the study cohort due to a higher percentage of patients with severe AH (Maddrey’s DF ≥ 32) and a lower incidence of severe bacterial infections. When stratifying patients using the ABIC score, we found that the confirmatory group had a higher percentage of patients with high risk of death compared with the study cohort (36% vs 12%, respectively, $P < 0.05$; Figs. 2 and 4). In patients with high risk of death, we did not find any benefit from corticosteroid therapy.

Table 3. Factors Associated With 90-Day Mortality in Multivariate Analysis in the Study Cohort

Variable	Multivariate Cox Regression		
	Hazard Ratio	95% CI	P Value
Age	1.11	1.04–1.18	0.001
Serum bilirubin	1.08	1.01–1.14	0.038
INR	2.13	1.00–3.72	0.05
Serum creatinine	1.31	1.07–1.90	0.015
In-hospital renal failure	4.92	1.86–13.03	0.001

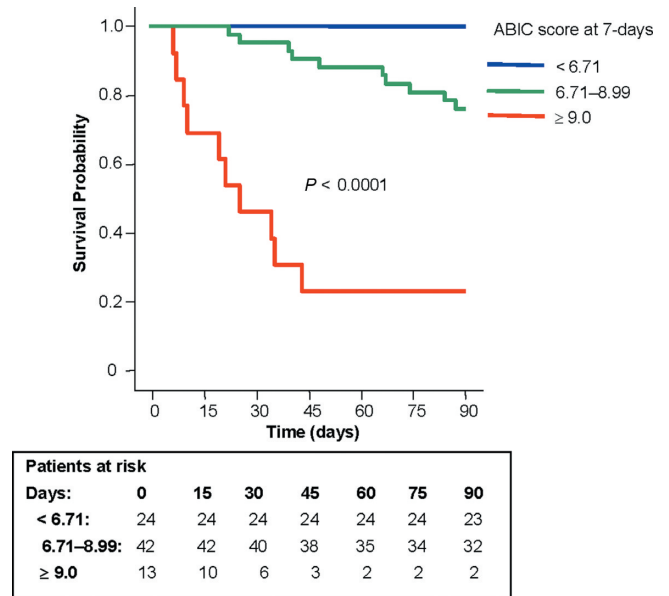
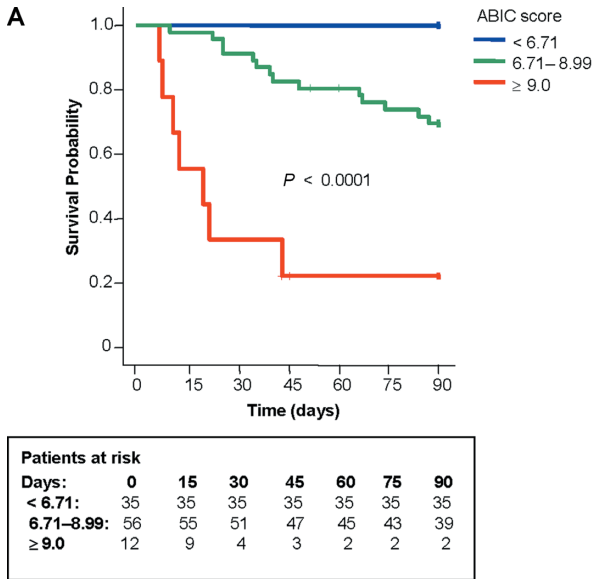


Figure 3. Kaplan-Meier curve showing 90-day survival analysis in the study cohort using a cutoff of the ABIC score at 7 days of 6.71 and 9.0.

Usefulness of the ABIC Score in Predicting 1-Yr Mortality

We next assessed the prognostic factors of 1-yr mortality that could be useful in assigning patients for liver transplantation. In the multivariate analysis, we considered all predictive indexes including the ABIC, Maddrey’s DF, the MELD, and the Glasgow scores. We found that the ABIC score was the only

Figure 2. (A). Kaplan-Meier curve showing 90-day survival in the study cohort according to the cutoff values of the ABIC score of 6.71 and 9.0. (B). Receiver-operating characteristic curves (ROC) showing 90-day survival using the ABIC score, the MELD score, Maddrey’s DF, and the Glasgow score in the study cohort.

Predictive Factors of 90-Day Mortality in the Subset of Patients Without Liver Cirrhosis

We next investigated the subset of patients without underlying cirrhosis (N = 41) and found that age (HR 1.26, 95% CI 1.06–1.51, P = 0.008), HPVG (HR 1.22, 95% CI 1.00–1.49, P = 0.045), and the MELD score (HR 1.94, 95% CI 1.22–3.07, P = 0.005) were independent predictors of 90-day mortality. Importantly, inclusion of the ABIC score in the multivariate analysis revealed that this score is the best predictive factor of short-term mortality in this group of patients (HR 25.14, 95% CI 2.76–228.34, P = 0.004). The AUC of the ABIC score was 0.85 (95% CI 0.69–1.00, P = 0.004), Maddrey’s DF 0.58 (95% CI 0.32–0.84, P = 0.5), the MELD score 0.71 (95% CI 0.51–0.91, P = 0.084), HPVG 0.74 (95% CI 0.54–0.93, P = 0.05), and the Glasgow score 0.71 (95% CI 0.50–0.91, P = 0.09).

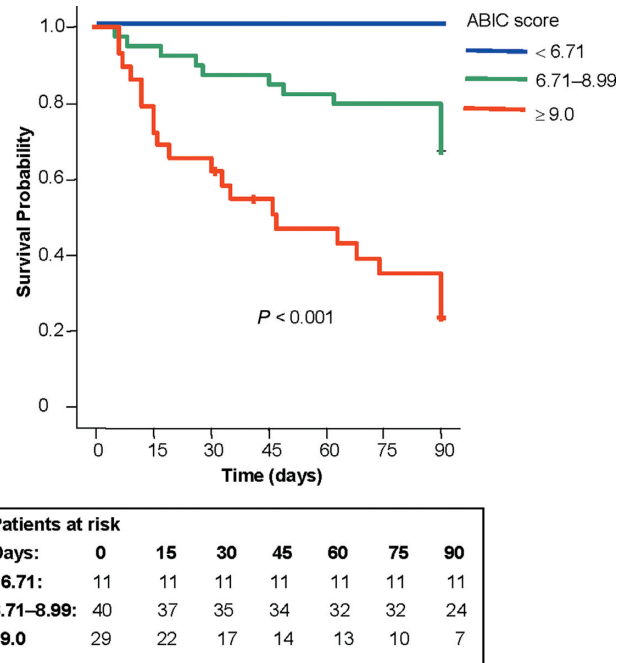


Figure 4. Kaplan-Meier curve showing 90-day survival analysis in the confirmatory cohort using a cutoff of the ABIC score of 6.71 and 9.0.

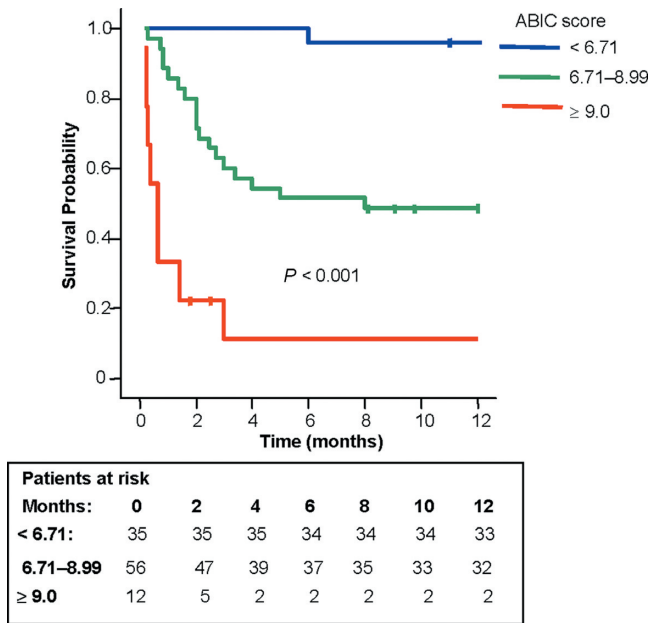


Figure 5. Kaplan-Meier curve showing 1-yr survival analysis in the study cohort using a cutoff of the ABIC score of 6.71 and 9.0.

independent predictor of 1-yr mortality (HR 2.49, 95% CI 1.77-3.52, $P = 0.0001$). The c-statistic for the ABIC score was 0.82 (95% CI 0.71-0.91, $P < 0.001$), which was higher than 0.76 (95% CI 0.65-0.86, $P < 0.001$) for the MELD score, 0.68 (95% CI 0.55-0.81, $P = 0.013$) for Maddrey’s DF, and 0.76 (95% CI 0.64-0.87, $P < 0.001$) for the Glasgow score. The cutoff values used for stratifying patients at 90 days (6.71 and 9.0) were also useful for an accurate patient stratification at 1 yr. The Kaplan-Meier analysis demonstrated that 97.1% of patients with an ABIC score < 6.71 were alive at 1 yr (Fig. 5). In addition, patients with an ABIC score between 6.71 and 8.99 had a 1-yr survival of 64.3%, and those patients with a score ≥ 9.0 had a 1-yr survival of 33.3% ($P < 0.001$).

DISCUSSION

The short-term mortality in patients with AH remains high, and the available therapies are not fully effective. An accurate prognostic stratification will certainly help in the clinical management of these patients as well as in the design of clinical trials. The score described in the current study includes parameters that can be easily obtained at admission, which allows a rapid identification of the prognosis. In particular, the ABIC score identifies both patients with a good prognosis, which can be managed with standard treatment (including nutritional and psychological support), and those with high risk of death, who could be the potential candidates for new therapeutic interventions. Interestingly, we found that alcohol abstinence did not impact survival in patients with AH. This result may be due to the fact that most patients had severe disease with advanced cirrhosis that is not reversible after

alcohol abstinence. Moreover, patient mortality mainly occurred during the first 90 days after the episode of AH, and in this time period, most patients were severely sick, and therefore, alcohol abstinence may have been easier to achieve.

In recent years, various studies have investigated the usefulness of different scores in predicting a short-term prognosis in patients with AH (4, 5, 21-23, 25, 26). Most studies include noninvasive parameters (demographic, biochemical, and clinical), while the prognostic value of invasive parameters such as histological and hemodynamic findings is largely unknown. Here, we include both invasive and noninvasive parameters. The histological changes in patients with heavy alcohol intake (hepatocellular damage, steatosis, polymorphonuclear cell infiltration, fibrosis, etc.) are commonly used to detect the presence of AH. However, until now, it was unknown if the degree of histological damage found in liver specimens has a prognostic impact on these patients. The histological parameters such as cirrhosis, hepatocellular damage, and lobular fibrosis (“chicken-wiring” fibrosis), among others, did not influence the prognosis, probably because age and parameters of liver and renal function have a strong impact on survival.

Maddrey’s DF has been widely used for identifying patients with severe AH (19, 20). In the original studies, patients with AH and a Maddrey’s DF ≥ 32 have 50% of short-term mortality rate. We found that up to 29% of patients with nonsevere AH (defined as a Maddrey’s DF < 32) died at 90 days. Importantly, all these patients had an ABIC score > 6.71 , suggesting that our score is more accurate in identifying patients with a bad prognosis. In addition, our score has a greater c-statistic than Maddrey’s DF. The main difference in our score compared with Maddrey’s DF is that it includes serum creatinine and age. Our results suggest that renal function at admission impacts the outcome. Moreover, previous observations have shown that age is an important predictor of short-term and long-term mortality in these patients (5). Other studies found that the MELD score, initially developed to predict survival in patients with cirrhosis and portal hypertension, is a good predictor of short-term mortality in patients with AH (21, 23, 25, 26). However, these studies are mostly retrospective, including some patients without histological confirmation and with HCV infection, HBV infection, or drug toxicity. The cutoff values for the MELD score to identify patients with severe AH are still controversial, and therefore, it does not allow the stratification of patients with good, intermediate, and poor prognosis. The ABIC score includes similar parameters as the MELD score, except for patient’s age. The high predictive value of our scoring system is probably influenced by the impact of each variable in the equation, and not just the added value of age.

Corticosteroids are still considered the gold-standard treatment in patients with severe AH. Despite the large number of studies (13 randomized controlled trials and 6 meta-analyses), there are concerns over their use in this setting (29). In our center, patients with severe AH without signs of severe active infections are treated with corticosteroids.

In the multivariate analysis, corticosteroid treatment was not associated with a different outcome.

Recently, the Lille model has shown to have a high sensitivity and specificity in predicting survival at 6 months in subjects with AH treated with corticosteroids who do not improve after 7 days of treatment (27). This model contains six parameters: age, renal dysfunction, albumin, prothrombin time, bilirubin, and evolution of bilirubin at 7 days. The Lille model is used to identify patients who do not respond to corticosteroids after 7 days of treatment, as indicated by 6-month mortality. We reanalyzed the data including only patients treated with prednisolone. We found that the ABIC score at 7 days has a better diagnostic accuracy than the Lille model in predicting mortality at 6 months. Probably, the ABIC score at 7 days is also able to identify patients who do not respond to corticosteroid therapy. We also assessed the parameters obtained after 7 days of treatment that influence survival. We found that, besides an elevation in serum bilirubin, a rise in INR, but not creatinine, also influences survival. These data indicate that parameters indicative of liver function (bilirubin and INR) are good predictors of response to treatment with corticosteroids.

The reanalysis in the subgroup of patients treated with prednisone shows that the ABIC score obtained at admission is already capable of identifying patients who respond to therapy. We found that the response to corticosteroids in patients with intermediate risk of death was greater than in patients with high risk of death. These results suggest that our scoring system may help to identify patients responding to corticosteroids at admission, and that probably patients with low and high risk of death do not benefit from treatment with corticosteroids. These findings should be validated in further studies.

A relevant finding of the current study is that the development of in-hospital renal failure increases almost five-fold the risk of short-term and long-term mortality in patients with AH. In fact, those patients with a good prognosis (ABIC score <6.71) did not develop in-hospital renal failure. This finding may have implications in the management of patients with severe AH. The maneuvers aimed at preventing renal impairment (avoiding nephrotoxic drugs, prevention of bacterial infections, plasma volume expansion, if needed, etc.), should be considered in this subset of patients. Further studies should investigate the typical forms, clinical characteristics, prognosis, and treatment of renal failure in patients with AH. Other complications, including bacterial infections and hepatic encephalopathy (either spontaneous or secondary), were not independent predictors of mortality.

A recent study showed that an HPVG >22 mmHg is an independent predictor of in-hospital mortality in patients with severe AH (24). However, in our study, the degree of portal hypertension was a predictive factor of short-term mortality only in patients without established cirrhosis. It is possible that in these patients, hepatocellular damage and hepatic inflammation temporarily increase HPVG, and thus, portal hypertension in patients without cirrhosis reflects severe necroinflammatory injury. Nevertheless, the ABIC score is

still a better predictor than HPVG in this subset of patients. Further studies should investigate the clinical impact of portal hypertension in these patients.

Our study has some limitations. First, the confirmatory cohort includes patients with more severe AH and greater mortality than the study cohort. However, the results are similar in both cohorts. Second, some patients with clinically suspected AH could not be included in the final analysis because they died during the first 48 h of admission and a liver biopsy was not obtained. Nevertheless, this subset of patients with an ominous prognosis included only 7 patients.

In conclusion, age and parameters indicative of renal and hepatic function are good predictors of survival in patients with AH, independent of histological parameters and/or HPVG. The stratification of patients with AH may have potential clinical implications. Patients with an ABIC score <6.71 have an excellent short- and long-term prognosis. Specific treatments for attenuating AH do not seem to be indicated in this group. In contrast, patients with intermediate death risk can benefit from established medical treatment such as corticosteroids or pentoxifylline. Finally, patients with a high risk of death (ABIC score ≥ 9.0) could benefit from an aggressive management including prevention of renal failure, hepatic encephalopathy, and antibiotic prophylaxis. We propose that prospective studies should evaluate the benefit of antibiotic prophylaxis and new therapeutic options in this subset of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Elena Juez and Cristina Millan for their excellent technical support, all personnel of the Liver Hemodynamic Unit, and Edgar Ayala for his statistical support. We thank Eva Urtasun, Andrés Cárdenas, and Nicola van Berckel for reviewing the manuscript.

STUDY HIGHLIGHTS

What Is Current Knowledge

- Alcoholic hepatitis (AH) is a severe condition with high mortality rates (30–50%).
- The current therapy (corticosteroids) is not fully effective.
- There are several scoring systems to identify patients with severe AH.

What Is New Here

- This study includes patients with biopsy-proven AH.
- It is the first study that includes epidemiological, biochemical, clinical, histological, and hepatic hemodynamic parameters.
- Our scoring system is a new, simple, and practical tool for clinicians to identify patients with low, intermediate, and high risk of death.

Reprint requests and correspondence: Ramón Bataller, M.D., Liver Unit, Institut Clínic Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

Received December 10, 2007; accepted May 27, 2008.

REFERENCES

- Elphick DA, Dube AK, McFarlane E, et al. Spectrum of liver histology in presumed decompensated alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:780–8.
- Saito H, Ishii H. Recent understanding of immunological aspects in alcoholic hepatitis. *Hepato Res* 2004;30:193–8.
- Tome S, Lucey MR. Current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;19:707.
- Kulkarni K, Tran T, Medrano M, et al. The role of the discriminant factor in the assessment and treatment of alcoholic hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:453–9.
- Forrest EH, Evans CD, Stewart S, et al. Analysis of factors predictive of mortality in alcoholic hepatitis and derivation and validation of the Glasgow alcoholic hepatitis score. *Gut* 2005;54:1174–9.
- Mathurin P, Abdelnour M, Ramond MJ, et al. Early change in bilirubin levels is an important prognostic factor in severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. *Hepatology* 2003;38:1363–9.
- Purohit V, Russo D. Cellular and molecular mechanisms of alcoholic hepatitis: Introduction and summary of the symposium. *Alcohol* 2002;27:3–6.
- Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad Med J* 2000;76:280–6.
- Alcoholic liver disease: Morphological manifestations. Review by an international group. *Lancet* 1981;1:707–11.
- Sougioultzis S, Dalakas E, Hayes PC, et al. Alcoholic hepatitis: From pathogenesis to treatment. *Curr Med Res Opin* 2005;21:1337–46.
- Rongey C, Kaplowitz N. Current concepts and controversies in the treatment of alcoholic hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006;12:6909–21.
- Phillips M, Curtis H, Portmann B, et al. Antioxidants versus corticosteroids in the treatment of severe alcoholic hepatitis—a randomised clinical trial. *J Hepatol* 2006;44:784–90.
- Mathurin P, Taieb J, Poynard T. Corticosteroid therapy in acute severe alcoholic hepatitis: The end of a controversy? *Gastroenterol Clin Biol* 1998;22:991–5.
- Mathurin P, Mendenhall CL, Carithers RL, et al. Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis (AH): Individual data analysis of the last three randomized placebo controlled double blind trials of corticosteroids in severe AH. *J Hepatol* 2002;36:480–7.
- Mathurin P. Corticosteroids for alcoholic hepatitis—what's next? *J Hepatol* 2005;43:526–33.
- Akriviadis E, Botla R, Briggs W, et al. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:1637–48.
- Naveau S, Chollet-Martin S, Dharancy S, et al. A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2004;39:1390–7.
- Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, et al. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: Correlation with disease severity. *Gastroenterology* 2007;132:687–97.
- Carithers RL Jr, Herlong HF, Diehl AM, et al. Methylprednisolone therapy in patients with severe alcoholic hepatitis. A randomized multicenter trial. *Ann Intern Med* 1989;110:685–90.
- Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, et al. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:193–9.
- Dunn W, Jamil LH, Brown LS, et al. MELD accurately predicts mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2005;41:353–8.
- Forrest EH, Morris J, Stewart S, et al. The Glasgow alcoholic hepatitis score identifies patients who may benefit from corticosteroids. *Gut* 2007;56:1743–46.
- Jeong JY, Sohn JH, Son BK, et al. Comparison of model for end-stage liver disease score with discriminant function and Child-Turcotte-Pugh scores for predicting short-term mortality in Korean patients with alcoholic hepatitis. *Korean J Gastroenterol* 2007;49:93–9.
- Rincon D, Lo IO, Ripoll C, et al. Prognostic value of hepatic venous pressure gradient for in-hospital mortality of patients with severe acute alcoholic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:841–8.
- Sheth M, Riggs M, Patel T. Utility of the Mayo end-stage liver disease (MELD) score in assessing prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *BMC Gastroenterol* 2002;2:2.
- Srikureja W, Kyulo NL, Runyon BA, et al. MELD score is a better prognostic model than Child-Turcotte-Pugh score or discriminant function score in patients with alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2005;42:700–6.
- Louvet A, Naveau S, Abdelnour M, et al. The Lille model: A new tool for therapeutic strategy in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids. *Hepatology* 2007;45:1348–54.
- Bosch J, Garcia-Pagan JC, Berzigotti A, et al. Measurement of portal pressure and its role in the management of chronic liver disease. *Semin Liver Dis* 2006;26:348–62.
- Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;4:24–34.

CONFLICT OF INTEREST

Guarantor of the article: Ramón Bataller, M.D.

Specific author contributions: Marlene Dominguez was responsible for the data assembly and analysis as well as for producing the final manuscript. Diego Rincón and Rafael Bañares were responsible for data collection in confirmatory cohort. Rosa Miquel was responsible for histological analysis. Juan G. Abruñales assisted with statistical analysis and correction of the manuscript. Jordi Colmenero was responsible for the conception of the study and correction of the manuscript. Pablo Bellot and Joan-Carles García-Pagán were responsible for the assessment of hepatic hemodynamic. Rosamelia Fernández and Montserrat Moreno were responsible for data collection of the study cohort. Vicente Arroyo, Joan Caballería, and Pere Ginès assisted in the design of the study, recruitment of patients, and preparation of the manuscript. Ramón Bataller planned the study and provided scientific management, analysis, interpretation, and preparation of the final manuscript.

Financial support: This work is supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Dirección

General de Investigación (SAF 2005-06245), and the Instituto de Salud Carlos III (FIS 05/050567 and FIS PI 060085). Marlene Dominguez had a grant from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and from the Fundación Banco Bilbao Vizcaya Argen-

taria (FBBVA). Montserrat Moreno had a grant from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

Potential competing interests: None.

ESTUDIO 2: La Expresión Hepática de Quimiocinas CXC Predice la Supervivencia y la Hipertensión Portal en Pacientes con Hepatitis Alcohólica (Aceptado para publicación en *Gastroenterology*, enero 2009).

La patogénesis de la HA es poco conocida. Pacientes con ingesta elevada de alcohol tienen un incremento de la permeabilidad intestinal a las endotoxinas presentes en la pared de bacterias Gram negativas. Las endotoxinas alcanzan la circulación portal y sistémica y en el hígado produce la activación de células de Kupffer, reclutamiento de neutrófilos e incremento en la producción de citocinas incluyendo TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8. El grado de infiltración de neutrófilos y los niveles séricos de algunas citocinas se correlacionan con la gravedad y el pronóstico de la HA.

Un estudio previo realizado en nuestro grupo encontró que los pacientes con HA tienen un incremento en la expresión hepática de IL-8 y Gro- α [54], las cuales pertenecen al grupo de quimiocinas CXC ELR+ con propiedades atrayentes de neutrófilos. Además, otros estudios han demostrado que la IL-8 está presente en el endotelio vascular, células inflamatorias, conductos biliares intrahepáticos y en los septos fibrosos (49). También se ha encontrado que pacientes con HA tienen niveles séricos elevados de IL-8 y que esto se asocia con la gravedad y con el pronóstico de estos pacientes.

El presente estudio fue realizado para investigar el papel patogénico de las quimiocinas CXC en pacientes con HA confirmada histológicamente y evaluar el impacto de estas quimiocinas sobre la gravedad y el pronóstico de estos pacientes.

Resultados principales

Se incluyó 105 pacientes con HA confirmada histológicamente y se evaluó la expresión génica de quimiocinas CXC en 49 pacientes.

1- Los pacientes con HA tienen incrementada la expresión hepática de algunas quimiocinas CXC y se asocia con el pronóstico de estos pacientes

- Se encontró 6 genes sobre-expresados en el hígado de pacientes con HA en comparación con los hígados controles incluyendo IL-8, ENA-78, Gro- α , GCP-2, PF4 y γ IP10 (Tabla 3 del manuscrito). La IL-8, una de las citocinas más representativas de este grupo, se sobre-expresó 14 veces más en pacientes con HA que en los controles.
- Se evaluó la expresión génica hepática de IL-8 en pacientes con hepatitis crónica C y se encontró que estos pacientes tenían una expresión reducida de esta citocina en comparación con controles y con pacientes con HA.
- Se evaluó la expresión hepática de dos quimiocinas CC (MCP-1 y RANTES). Pacientes con HA tenían sobre-expresado MCP-1 en comparación con los controles, pero RANTES no estuvo diferencialmente expresado en el hígado de los pacientes con HA en comparación con los hígados controles.
- La sobre-expresión hepática de 4 genes de quimiocinas CXC ELR+: IL-8, ENA-78, Gro- γ y GCP-2 se asoció con una mayor mortalidad a 90 días y con la gravedad de la enfermedad según el índice ABIC a los 7 días (Figura 1 del manuscrito). Por el contrario, la expresión génica hepática de quimiocinas CXC

ELR- (PF4 y γ -IP10) y CC (MCP-1 y RANTES) no se asoció con mayor mortalidad ni con gravedad de la enfermedad.

- Pacientes con HA que tenían una mayor infiltración de neutrófilos en el hígado presentaron mayor sobre-expresión génica hepática de quimiocinas CXC y sus receptores: IL-8 ($p=0,02$), ENA-78 ($p=0,048$), Gro- γ ($p=0,02$), Gro- α ($p=0,009$), CXCR1 ($p=0,006$) y CXCR2 ($p=0,008$) (Figura 2 del manuscrito). El infiltrado linfocitario en el hígado no se asoció con la expresión génica.
- Pacientes con mayor grado de hipertensión portal (GPVH >20 mmHg) tuvieron una mayor expresión génica de IL-8 ($p=0,01$), ENA-78 ($p=0,007$) y Gro- γ ($p=0,032$) (Figura 3 del manuscrito).
- La expresión génica hepática de IFN- γ y STAT-1 no mostró diferencias en pacientes con HA en comparación con los controles. La expresión de estos genes se correlacionó con la expresión génica hepática de quimiocinas CC, pero no con la expresión de quimiocinas CXC.

2- Los pacientes con HA tienen niveles séricos elevados de IL-8 y Gro- α

Los niveles séricos de IL-8 y Gro- α fueron medidos en el subgrupo de pacientes con HA en el cual se evaluó la expresión génica hepática de quimiocinas.

- Se demostró que los pacientes con HA tienen niveles séricos de IL-8 y Gro- α elevados. Sin embargo, no se correlacionó con la gravedad de la enfermedad ni con el pronóstico de estos pacientes.

- Se demostró una correlación lineal positiva entre los niveles séricos de IL-8 y Gro- α en pacientes con HA.
- Los niveles séricos de IL-8 se correlacionó débilmente con la expresión génica hepática de IL-8, ENA-78, Gro- α , PF4 y CXCR1, pero no se correlacionó con complicaciones clínicas, parámetros analíticos, histológicos o hemodinámicos hepáticos.
- Pacientes con mayor grado de hipertensión portal (GPVH >20 mmHg) presentaron niveles séricos elevados de Gro- α . Los niveles séricos de Gro- α no se correlacionó con la expresión génica hepática de quimiocinas CXC, MCP-1 o RANTES.

3- La expresión proteica hepática de IL-8 y ENA-78 está asociada con el pronóstico de los pacientes con HA

Se evaluó el valor pronóstico del GPVH y de los parámetros histológicos, tales como esteatosis, colestasis, infiltración inflamatoria (neutrófilos y linfocitos), apoptosis, expresión proteica hepática de IL-8, ENA-78 y Gro- α en la serie completa de 105 pacientes con HA.

- La expresión proteica de IL-8, ENA-78 y Gro- α evaluada por inmunohistoquímica se localizó en hepatocitos y en células no parenquimatosas.
- La expresión hepática moderada/marcada de IL-8 y ENA-78, la ausencia de esteatosis o esteatosis leve, la presencia de colestasis y el GPVH se asoció

con mayor mortalidad a 90 días. En el análisis multivariado, la expresión hepática moderada/marcada de IL-8, el GPVH y la presencia de colestasis hepática fueron predictores independientes de mortalidad a 90 días.

- En el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier se observó que pacientes con una expresión hepática ausente o leve de IL-8 o ENA-78 tenían una mayor supervivencia a 90 días en comparación con los pacientes con una expresión hepática moderada o marcada de estas quimiocinas.
- La expresión hepática de Gro- α , el grado de infiltrado inflamatorio o el grado de apoptosis hepatocelular no se asoció con la gravedad ni con el pronóstico de los pacientes con HA.

Accepted Manuscript

Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis

Marlene Dominguez, Rosa Miquel, Jordi Colmenero, Montserrat Moreno, Joan-Carles García-Pagán, Jaime Bosch, Vicente Arroyo, Pere Ginès, Juan Caballería, Ramón Bataller



PII: S0016-5085(09)00160-7
DOI: 10.1053/j.gastro.2009.01.056
Reference: YGAST 55163

To appear in: *Gastroenterology*

Received date: 5 August 2008
Revised date: 19 January 2009
Accepted date: 29 January 2009

Please cite this article as: Dominguez, M., Miquel, R., Colmenero, J., Moreno, M., García-Pagán, J.C., Bosch, J., Arroyo, V., Ginès, P., Caballería, J., Bataller, R., Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis, *Gastroenterology* (2009), doi: 10.1053/j.gastro.2009.01.056.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**HEPATIC EXPRESSION OF CXC CHEMOKINES PREDICTS PORTAL
HYPERTENSION AND SURVIVAL IN PATIENTS WITH ALCOHOLIC HEPATITIS**

Short title: **CXC Chemokines in Alcoholic Hepatitis**

**MARLENE DOMINGUEZ¹, ROSA MIQUEL², JORDI COLMENERO¹, MONTSERRAT
MORENO¹, JOAN-CARLES GARCÍA-PAGÁN¹, JAIME BOSCH¹, VICENTE ARROYO¹,
PERE GINÈS¹, JUAN CABALLERÍA¹ AND RAMÓN BATALLER¹.**

*¹Liver Unit. ²Pathology Unit. Hospital Clínic. Institut d'Investigacions Biomèdiques
August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas
(CIBERehd). Barcelona, Catalonia, Spain.*

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest.

Abbreviations: Alcohol-induced liver disease (ALD), alcoholic hepatitis (AH), γ -glutamyl transpeptidase (GGT), hazard ratio (HR), hepatic venous pressure gradient (HVPG), international normalized ratio (INR), interleukin 8 (IL-8), chemokine receptor 1 (CXCR1), chemokine receptor 2 (CXCR2), platelet factor 4 (PF4), epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78), granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2), interferon-gamma-induced protein 10 (γ IP10), pro-platelet basic interferon (PPBP), gamma-interferon (IFN- γ), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), signal transducer and activator of transcription factor 1 (STAT-1), tumor necrosis alpha (TNF- α) and regulated upon activation, normally T-expressed, and presumably secreted (RANTES).

Corresponding author:

Ramón Bataller, MD

Liver Unit, Hospital Clínic

Villarroel 170. 08036. Barcelona, Spain

Phone: +34-932275499.

e-mail: bataller@clinic.ub.es.

Abstract

Background & Aims: Alcoholic hepatitis (AH) is characterized by hepatocellular damage, inflammation and fibrosis. We performed a prospective study to associate hepatic expression of the CXC subfamily of chemokines with histology findings and prognosis of patients with AH. **Methods:** Liver biopsy samples from 105 patients with AH and 5 normal liver samples (controls) were evaluated for steatosis, inflammation, fibrosis and cholestasis. Computer-based morphometric analysis assessed numbers of infiltrating CD3⁺ T cells and CD15⁺ cells (neutrophils); TUNEL staining was used to quantify apoptosis. Expression of CXC and CC chemokines and selected signaling components were assessed by quantitative RT-PCR; protein levels of IL-8 and Gro- α were also determined by immunohistochemistry. Serum levels of IL-8 and Gro- α were measured by ELISA. The Cox regression model identified variables associated with mortality.

Results: Most patients (75%) had a severe AH; their 90-day mortality rate was 21.9%. In AH liver samples, expression of the CXC subfamily members IL-8, Gro- α , CXCL5, CXCL6, CXCL10 and platelet factor 4 was upregulated, compared to controls. The CC chemokine CCL2, but not CCL5, was also up-regulated. Higher expression levels of IL-8, CXCL5, Gro- γ and CXCL6 were associated with worse prognosis. Expression of CXC components correlated with neutrophil infiltration and the severity of portal hypertension. In the multivariate analysis, IL-8 protein levels were an independent predictor of 90-day mortality. IL-8 and Gro- α serum levels did not correlate with prognosis.

Conclusions: Hepatic expression of CXC components correlates with prognosis of patients with AH. Reagents that target CXC chemokines might be developed as therapeutics.

Introduction

Alcoholic hepatitis (AH) occurs in patients with heavy alcohol intake and it is characterized by hepatocellular damage, inflammatory cell infiltrate -predominantly by neutrophils- and rapidly progressive fibrosis.¹ The severe forms are associated with liver failure and portal hypertension, leading to a short-term poor prognosis.^{2, 3} Current therapies for this condition fail in many patients. Prognosis of patients with AH has been assessed using the Maddrey's Discriminant Function.⁴ Recently, we described the ABIC score, a new scoring system allows prognostic stratification of these patients.⁵ The ABIC score identifies patients with low (<6.71), intermediate (6.71-8.99) and high risk (≥ 9) of death at 90-day and 1-year.

The pathogenesis of AH is poorly understood. An interaction between neutrophils and cytokines may play a role.⁶ Patients with chronic alcohol abuse have increased endotoxin serum levels leading to Kupffer cell activation, neutrophil recruitment and increased production of cytokines.^{6, 7} The degree of neutrophil infiltration as well as serum levels of pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor alpha (TNF- α), interleukins (IL) 1, 6 and 8, are associated with disease severity.⁷⁻⁹ However, the use of monoclonal antibodies against TNF- α in patients with severe AH is associated with more severe infections and higher mortality rate.^{10, 11}

Chemokines are classified into 4 subfamilies: CC, CXC, CX3C and C. CXC chemokines can be subclassified into ELR⁺ or ELR⁻ based on the presence of a tripeptide motif ELR (Glu-Leu-Arg) at the NH₂ terminus. The ELR motif appears to be important in ligand/receptor interactions on neutrophils. IL-8, CXCL5, CXCL6, CXCL7, Gro- α , Gro- β and Gro- γ are ELR⁺ CXC family. In contrast, ELR⁻ CXC chemokines have a reduced ability to induce neutrophil chemotaxis. This subgroup includes γ IP-10 (interferon-gamma-induced protein) and PF4 (platelet factor 4). Importantly, ELR⁺ chemokines bind CXCR1 and CXCR2, while γ IP-10 and PF4 interact with CXCR3.^{12, 13}

We hypothesize that CXC chemokines, in particular ELR⁺ CXC chemokines, may play an important role in the pathogenesis of AH. This assumption is based on the following data: i) CXC family of chemokines includes a number of ligands and receptors that play a major role in neutrophil infiltration of chronically damaged tissues.¹⁴⁻¹⁶ ii) Neutrophil infiltration is a hallmark histological finding in patients with AH and has prognostic significance.¹⁷⁻²³ iii) Livers from patients with AH have overexpression of IL-8 and Gro- α compared to normal livers.^{23, 24} Moreover, studies in patients with AH have demonstrated that IL-8 is present in vascular endothelium, inflammatory cells, intrahepatic bile ducts and in fibrous septa.²⁵ And iv) it is likely that the biological effects of CXC chemokines on liver cells may play a role in AH.²

The current study was undertaken to investigate the pathogenic role of CXC chemokines in AH. For this purpose, we investigated the impact of hepatic gene expression of CXC chemokines on disease severity and survival in patients with AH.

Materials and Methods

Patients

We prospectively included patients admitted to the Liver Unit (Hospital Clínic, Barcelona) between January 2000 and September 2007 with clinical, analytical and histological features of AH. Inclusion criteria were: patients with active alcohol abuse were defined according to Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)²⁶ and excessive ethanol consumption (>60 gr/d) for at least three months prior to admission; elevated aminotransferases (aspartate aminotransferase, AST > alanine aminotransferase, ALT), high γ -glutamyl transpeptidase (GGT) and bilirubin serum levels and histological diagnosis of AH characterized by the presence of hepatocellular damage (hepatocellular ballooning and presence of Mallory bodies), inflammatory infiltrate (neutrophils) and pericellular fibrosis. Patients with hepatocellular carcinoma or any other potential cause of liver disease were excluded from the study. Liver biopsy was obtained using a transjugular approach due to that most patients with AH have severe coagulation disorders and in order to measure portal pressure gradient. All patients received nutritional and psychological support for achieving alcohol abstinence. Patients with severe AH (ABIC score ≥ 6.71) were treated with 40 mg/day prednisone for 4 weeks followed by a two week taper, unless they had any contraindication (severe bacterial infection or diabetes mellitus with poor metabolic control) to corticosteroid treatment. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic and all patients gave informed consent.

Histological Analysis and Hepatic Hemodynamic Measurements

Liver biopsies were formalin-fixed and paraffin-embedded. Liver specimens (3 μ m thick) were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome. Biopsies were blindly assessed by the same pathologist (R.M.). Histological analysis was performed as follows: i) degree of hepatocellular damage/ballooning (0: none; 1: mild; 2: moderate or severe) and presence of Mallory bodies, giant mitochondries and cholestasis (0: no; 1: yes); ii) degree of lymphocytic infiltration (0: none; 1: mild; 2: moderate; 3: severe); iii) degree of neutrophil infiltration (0: none; 1: mild; 2: moderate; 3: severe); iv) degree of steatosis (0: <10%; 1: 10-

33%; 2: 33-66%; 3: >66%); v) steatosis type (0:macrovesicular; 1: microvesicular; 2: mixte); vi) steatosis distribution (0: focal; 1: diffuse); vii) degree of lobular fibrosis (0: none; 1: mild; 2: moderate; 3: severe); viii) lobular fibrosis distribution (0: zone 3; 1: zone 2 and 3; 2: panlobular); ix) fibrosis stage (0: no fibrosis; 1: portal; 2: portal fibrosis and few septa; 3: septal fibrosis without cirrhosis; 4: cirrhosis), x) cholestasis type (0: canallicular; 1: mild hepatocellular; 2: severe hepatocellular; 3:canallicular and hepatocellular).

Hepatic hemodynamic assessment was performed within 48 hours of admission. The portal pressure was estimated on the hepatic venous pressure gradient (HVPG), as described in detail previously.²⁷

Hepatic Gene Expression Analysis

Hepatic gene expression was evaluated in 49 patients. In the remaining patients, the amount of liver tissue obtained only allowed histological analysis. Liver biopsies were submerged in a RNA stabilization solution (RNAlater, Ambion, Austin, TX) and stored at -20 °C until RNA extraction. Total RNA was extracted with TRIzol (Life Technologies Inc., Rockville, MD). RNA integrity and concentration was assessed with a micro fluidic glass chip platform (Bioanalyzer 2100, Agilent, Palo Alto, CA). Five hundred micrograms of total RNA were retrotranscribed with a high capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Eleven pre-designed Taq-Man assays for target genes of CXC chemokines family were assessed in patients with AH: CXCL1 or Gro- α , CXCL2 or Gro- β , CXCL3 or Gro- γ , CXCL4 or PF4, CXCL5 or epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78), CXCL6 or granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2), CXCL7 or pro-platelet basic protein (PPBP), interleukin-8 (IL-8), CXCL10 or γ IP10, CXCR1 (CXC receptor 1) or IL8RA (IL-8 receptor A) and CXCR2 (CXC receptor 2) or IL8RB (IL-8 receptor B). These genes were selected and distributed into a 384 wells Taq-Man Low Density Array cards (Applied Biosystems). Samples were analyzed for quadruplicate using an ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) as described in detail elsewhere²⁸. Additionally, genes encoding CC chemokines such as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1 or CCL2) and regulated upon activation, normally T-expressed, and presumably secreted (RANTES or CCL5),

interferon gamma (IFN- γ) and signal transducer and activator of transcription factor 1 (STAT-1) were assessed by quantitative PCR. TaqMan reactions were carried out in duplicate. Expression levels of target genes were normalized to expression of 18S rRNA (endogenous gene). Gene expression values were calculated based on the $\Delta\Delta C_t$ method.²⁹ The results were expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ referred as fold in relation with mean normal livers.

Selection of Control Livers

Normal livers were obtained from optimal cadaveric liver donors (n=3) or resection of liver metastases (n=2). All controls had normal serum aminotransferase levels and normal liver histology. Criteria to obtain normal livers were: 1) no past history of liver disease, alcohol abuse or metabolic syndrome; 2) absence of maintained arterial hypotension before laparotomy; 3) normal serum levels aminotransferases; 4) time of brain death to laparotomy less than 12 hours; 5) normal liver histology; 6) no use of vasodilator drugs; and 7) liver specimens obtained immediately after laparotomy and before vascular clamp. The samples acquired during surgical liver resection for secondary liver cancer were obtained at a minimum of 5 cm from the tumor.

Assessment of IL-8 Hepatic Gene Expression in Patients with Chronic Hepatitis

C.

Hepatic gene expression of IL-8 was also evaluated in patients with chronic hepatitis C. Patients with detectable serum RNA HCV (hepatitis C virus) and elevated alanine aminotransferase (ALT) underwent a percutaneous liver biopsy. Patients with HCV genotype 1 and without previous antiviral treatment were included (n=35). Patients with evidence of excessive alcohol intake (>20 gr/d) and other causes of liver disease were excluded. Liver specimens were analyzed by an expert pathologist (R.M) and a part of the biopsy was submerged into a RNA stabilization solution (RNAlater) and stored at -20 °C until RNA extraction. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic and all patients gave informed consent.

Immunohistochemical Studies

Paraffin-embedded sections were incubated with the following primary antibodies: anti-human CD15 monoclonal mouse (DakoCytomation, Glostrup), anti-human CD3 monoclonal mouse (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle), an anti-human IL-8 monoclonal mouse (Endogen, IL), anti-human ENA-78 and anti-human Gro- α monoclonal mouse (R&D Systems, MN). The number of lymphocytes (CD3 positive cells) and neutrophils (CD15 positive cells) was assessed using an image-analysis system (AnalySIS®, Soft-Imaging System, Münster, Germany). Twenty fields, using a 200x objective, were randomly chosen and the number of positive cells was counted in each specimen. The number of labeled cells with IL-8, ENA-78 and Gro- α was identified in 20 random high-power fields (200x objective). A semiquantitative analysis was performed as follows: 0: none, 1: mild, 2: moderate, 3: severe. All studies were blindly performed by the same observer (M.D.).

Identification of Cell Apoptosis by TUNEL

Apoptotic cells were identified by the TUNEL technique. Briefly, paraffin-embedded liver slices were incubated with 20 μ g/ml proteinase K (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and labeled using the *In situ* Cell Death Detection Kit (POD, Roche, Mannheim, Germany). Finally, sections were stained with DAB and counterstained with hematoxylin. The number of TUNEL-positive cells was counted using a 400x objective. Twenty fields were randomly chosen and the number of TUNEL-positive cells was counted in each specimen.

Serum Interleukin-8 and Gro- α Determination

Serum samples obtained from peripheral venous blood were analyzed in the subset of patients in which gene expression was studied. Blood was extracted within 48 hours from admission. Serum concentrations of IL-8 and Gro- α were measured in duplicate by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (BioSource Europe S.A, Belgium and R&D Systems, MN, respectively). IL-8 serum levels >15 pg/ml and Gro- α >118 pg/ml were considered abnormally high according to data from healthy controls obtained in our center.

Statistical Analysis

Results of quantitative variables are expressed as mean \pm SE, unless otherwise specified. Differences between groups were analyzed using non-parametric tests (Mann-Whitney U test) for continuous variables and χ^2 for categorical variables. Correlations between variables were evaluated using Spearman's rho. Univariate and multivariate analysis using Cox regression was employed to identify variables associated with 90-day mortality of AH. Variables with p-value <0.1 in the univariate model were entered into a backward stepwise elimination variable selection procedure. The criterion for retaining predictors was p-value less than 0.05. Survival curves by the Kaplan-Meier method were created and compared using the log-rank test. Statistical analysis was performed using SPSS version 14.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

General Characteristics of Patients

We prospectively identified 146 patients with clinical and analytical characteristics of AH. Forty-one patients did not meet all inclusion criteria and were excluded of final analysis. Finally, 105 patients met all criteria and were included in the study. Clinical, analytical and hepatic hemodynamic variables of these patients are shown in Table 1. The main causes of death at 90-days were sepsis (24.3%) and liver failure (43.2%). Seventy-six patients (73.1%) developed at least one major complication during hospitalization, including bacterial infection (44.2%), ascites (18.3%), hepatic encephalopathy (20.2%), renal failure (18.3%) and gastrointestinal bleeding (8.7%). The majority of patients had severe sinusoidal portal hypertension (median HVPG: 20 mmHg).

Hepatic histological characteristics are exposed in Table 2. The median length of the biopsy specimens was 6 millimeters, the median number of fragments was 5 and the median number of portal spaces was 7.

Hepatic Gene Expression Studies

We first analyzed hepatic gene expression of most components of the CXC chemokine family in livers with AH compared to normal livers. For this purpose, mRNA was obtained from a subset of patients. Clinical, analytical, histological and hemodynamic characteristics of this subgroup of patients were similar to the whole series (data not shown).

Among all studied genes, we found seven genes of the CXC family differentially regulated in livers with AH compared to control livers (Table 3). IL-8, the most representative component of this family, was found overexpressed by 14-fold compared to normal livers. Similarly, ENA-78, Gro- α , GCP-2, PF4 and γ -IP10 were also up-regulated in patients with AH.

We also studied the gene expression of IL-8, the hallmark component of the CXC chemokine family, in patients with chronic hepatitis C. Interestingly, patients with chronic hepatitis C showed reduced hepatic expression of IL-8 compared to normal livers (0.54 ± 0.09 expressed as $2^{\Delta\Delta CT}$, $p=0.038$). Moreover, patients with AH showed increased hepatic gene

expression of IL-8 (14.01 ± 2.57 expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$) compared to patients with chronic hepatitis C ($p=0.00002$).

Next, we explored hepatic gene expression of two CC chemokines (MCP-1 and RANTES). We found that MCP-1 was up-regulated in patients with AH compared to controls (fold expression = 3.40 ± 0.39 ; $p=0.008$). In contrast, RANTES was not found up-regulated (fold expression = 1.62 ± 0.15 ; $p=0.23$). Finally, hepatic gene expression of IFN- γ and STAT-1 did not differ in patients with AH from controls (fold expression: 1.84 ± 0.23 ; $p=0.57$ and 2.01 ± 0.22 ; $p=0.12$, respectively).

Relationship between Hepatic Gene Expression and Short-term Prognosis, Histological and Hemodynamic Data

We studied hepatic gene expression according to the short-term prognosis, as indicated by 90-day mortality. We found 4 genes overexpressed in patients who died at 90 days compared to those who survived: IL-8 ($p=0.042$), ENA-78 ($p=0.008$), Gro- γ ($p=0.046$) and GCP-2 ($p=0.02$) (Figure 1). Patients with severe AH (ABIC score ≥ 6.71) showed up-regulation of Gro- β ($p=0.006$) and Gro- γ ($p=0.036$). Interestingly, patients with an ABIC score obtained at 7 days ≥ 6.71 showed overexpression of 3 genes that were previously associated with short-term mortality: ENA-78 ($p=0.05$), Gro- γ ($p=0.023$) and GCP-2 ($p=0.04$). In contrast, hepatic expression of ELR⁻ CXC chemokines (PF4 and γ -IP10) and CC chemokines (MCP-1 and RANTES) was not associated with survival or severity disease.

We next correlated expression of CXC chemokines with histological findings. The median value of 52 cells/high power field was used as the cut-off value to define patients with low and high hepatic neutrophil infiltration. Patients with marked hepatic infiltration of neutrophils, (CD15+ staining), which is the main pathogenic role of this family of chemokines, showed up-regulation of six genes (Figure 2): IL-8 ($p=0.02$), ENA-78 ($p=0.048$), Gro- γ ($p=0.02$), Gro- α ($p=0.009$), CXCR1 ($p=0.006$) and CXCR2 ($p=0.008$). Lymphocyte infiltrate did not associate with gene expression.

Additionally, we investigated whether hepatic gene expression correlated with the severity of portal hypertension, which is a hallmark clinical feature of these patients. Patients with more severe portal hypertension (HVPG greater than the median value of the series -20 mmHg-) showed up-regulation of IL-8 ($p=0.01$), ENA-78 (0.007) and Gro- γ ($p=0.032$). (Figure 3). These results indicate that expression of key components of the ELR+ CXC chemokine subfamily correlates with clinical, hemodynamic and histological findings.

Systemic Serum Levels of IL-8 and Gro- α in patients with AH

Serum levels of IL-8 and Gro- α were elevated in all patients with AH (208 ± 44.6 pg/ml and 351.79 ± 67.48 pg/ml, respectively). Serum IL-8 and Gro- α levels did not correlate with 90-day mortality ($p=0.06$ and $p=0.49$, respectively) or with disease severity ($p=0.9$ and $p=0.75$, respectively). Interestingly, serum levels of IL-8 correlated with Gro- α levels ($r=0.96$, $p<0.0001$). Serum levels of IL-8 did not correlate with clinical complications, histological, analytical or hepatic hemodynamic parameters. However, serum IL-8 was correlated weakly with hepatic gene expression of IL-8 ($r=0.44$, $p=0.019$), ENA-78 ($r=0.45$, $p=0.016$), Gro- α ($r=0.38$, $p=0.048$), PF4 ($r=0.45$, $p=0.015$) and CXCR1 ($r=0.39$, $p=0.041$). Serum levels of Gro- α did not correlate with hepatic gene expression of CXC chemokines, MCP-1, RANTES, IFN- γ and STAT-1 or with clinical complications. Patients with HVPG >20 mmHg showed high serum levels of Gro- α ($p=0.048$). These results indicate that intrahepatic expression of IL-8, rather than systemic serum levels, correlate with disease prognosis.

Prognostic Value of Hemodynamic and Histological Parameters Including Immunohistochemistry Studies

We finally investigated the prognostic value of histological parameters such as steatosis, cholestasis, inflammatory infiltration (lymphocytes and neutrophils), apoptosis, protein expression (IL-8, ENA-78 and Gro- α), as well as hepatic hemodynamic parameters (HVPG) in the whole series of patients with AH ($n=105$). We found that livers with AH contain significant both neutrophil and lymphocyte infiltration (Figure 2A and B). Protein expression of IL-8, Gro- α and ENA-78 was localized in both hepatocytes and non-parenchymal cells.

Univariate analysis showed that moderate/marked expression of IL-8 (HR: 2.11; 95% CI: 0.91-4.89, $p=0.08$), moderate/marked expression of ENA-78 (HR: 3.14; 95% CI: 1.00-9.95; $p=0.049$), HVPG (HR: 1.08; 95% CI: 1.01-1.15, $p=0.035$), the presence of cholestasis (HR: 3.49; 95% CI: 1.04-11.75, $p=0.04$) and none/mild hepatic steatosis (HR: 0.98; 95% CI: 0.96-0.99, $p=0.018$) were associated with 90-day mortality. In the multivariate analysis, moderate/marked expression of IL-8 protein (HR: 2.9; 95% CI: 1.21-6.99, $p=0.017$), HVPG (HR: 1.12; 95% CI: 1.04-1.22, $p=0.004$) and the presence of hepatic cholestasis (HR: 5.74; 95% CI: 1.47-22.44, $p=0.012$) were independently associated with 90-day mortality (Table 4). A Kaplan–Meier survival analysis was performed to compare 90–day mortality according to the degree of protein expression of IL-8 and ENA-78. As shown in Figure 4, patients with moderate/marked protein expression of IL-8 or ENA-78 had lower survival at 90 days than patients with none/mild protein expression of IL-8 or ENA-78 ($p=0.041$ and $p=0.038$, respectively). The hepatic protein expression of Gro- α , the degree of inflammatory infiltration, either by lymphocytes or neutrophils, or the degree of apoptosis did not correlate with short-term mortality. Taken together, these data indicate that IL-8 and ENA-78 may play a role in the pathogenesis of severe AH.

Discussion

The current study investigates the potential pathogenic role of the CXC chemokine family in patients with biopsy-proven AH. We provide evidence that key chemokines of this family including IL-8 and ENA-78 are markedly overexpressed in the livers with AH. Importantly, hepatic expression of some of these genes correlates with short-term prognosis and the severity of portal hypertension. These results are in keeping with previously published data indicating that neutrophil-attracting chemokines such as Gro- α are increased in patients with AH.^{15, 24} Because the biological properties of ELR⁺ CXC chemokines include events found in the livers with AH such as infiltration by neutrophils, fibrogenesis and cell death, our results suggest a potential role for this subfamily of cytokines in this clinical condition.

Most of studies performed so far to identify the mediators of ALD have been performed in experimental models in rodents.³⁰⁻³² However, such models do not exactly mimic the histological features of severe ALD including AH.³³ In patients with AH, the main clinical consequences are related to the presence of hepatocellular injury and severe fibrosis.³⁴ It is therefore not surprising that clinical trials targeting cytokines identified in rodents with ALD (e.g. TNF- α) have not yield positive results.^{10, 11, 35} Therefore, we think that there is a clear need to perform translational studies with human samples to uncover the pathogenesis of AH in order to identify new targets for therapy. Here, we prospectively analyzed the expression of CXC chemokine family in patients with biopsy-proven AH. Two main reasons prompted us to choose these potential targets: previous data from our laboratory indicating that some chemokines are overexpressed in patients with AH, and that the biological properties of this family that may participate in ALD.^{7, 19, 24} Ethanol metabolism by hepatocytes may have influenced CXC chemokine production. In fact, acetaldehyde increases TNF- α -induced synthesis of IL-8 in cultured hepatocytes.¹⁵

In order to demonstrate a pathogenic role for these chemokines in humans, we perform two types of analysis. First, we assessed the gene expression of these chemokines

in the liver and correlated with the main clinical and histological characteristics of the patients. By demonstrating that several CXC chemokines were overexpressed in livers with AH and that their expression correlated with short-term mortality, we provide evidence suggesting a pathogenic role for these substances. Second, we demonstrated that hepatic protein expression of IL-8 is an independent predictor of short-term mortality in these patients. In contrast, we found that hepatic gene expression of Gro- α was markedly up-regulated in patients with AH, yet it was not associated with prognosis or disease severity. Gro- α is a less powerful neutrophil activator than IL-8, suggesting that IL-8 may be a more harmful inflammatory mediator in these patients.¹⁵ This fact could explain why Gro- α has no impact on survival or disease severity.

An important finding of our study is that hepatic expression of IL-8 and other ELR⁺ CXC chemokines correlate with the degree of portal hypertension. The clinical relevance of portal hypertension is indicated by the fact that HVPG is an independent predictor of 90-day mortality. This result is in keeping with previous studies showing that HVPG correlates with in-hospital mortality in patients with AH.³⁴

Our results suggest that increased CXC chemokines could contribute to neutrophil infiltration in patients with AH. We have found a heterogeneous inflammatory infiltrate (neutrophils and lymphocytes) in the livers with AH. However, the degree of lymphocyte infiltration did not correlate with clinical outcomes in our series. On the contrary, patients with severe AH had higher neutrophil infiltration in liver tissue. These results suggest that neutrophils, rather than lymphocytes, contribute to disease severity. We also found that patients with higher neutrophil infiltration had overexpression of three genes of the ELR⁺ CXC chemokine subfamily (IL-8, GCP-2 and Gro- γ), suggesting that these mediators contribute to attract neutrophil to the damaged liver.

Other finding of our study is that systemic serum levels of IL-8 and Gro- α do not correlate with disease prognosis. Instead, both gene and protein expression of IL-8 correlated with short-term mortality. Our results suggest that intrahepatic expression of IL-8,

rather than systemic serum levels, play a pathogenic role. However, previous published data suggest that serum IL-8 associate with severe AH.^{36, 37}

The results of the current study may have pathophysiological implications. First, increased CXC chemokine expression may play a major role in the recruitment of neutrophils, which is a hallmark biological property of this family of cytokines. Neutrophils are supposed to contribute to liver injury by releasing high amounts of oxygen reactive species and sensitizing hepatocytes to cell death.³⁸ Second, hepatic overexpression of CXC chemokines may directly induce hepatocellular injury. It is known that IL-8 and Gro- α stimulate intracellular pathways involved in parenchymal cell death.^{15, 16} Third, CXC chemokines may induce endothelial dysfunction in livers with AH. CXC chemokines are expressed in endothelial sinusoidal cells and participate in endotoxin-induced liver injury.³⁹ Finally, chemokines may participate in promoting liver fibrogenesis leading to severe disruption of the hepatic architecture and subsequent portal hypertension.^{39, 40} Activated stellate cells release large amounts of IL-8 in response to vasoactive agents. It is possible that IL-8 act on these cells in an autocrine manner promoting collagen synthesis.⁴¹ Other chemokines (e.g. MCP-1) induce fibrogenic signals in these cells.¹⁶

Previous studies have found that serum levels of IFN- γ are significantly elevated in patients with AH.⁴² IFN- γ stimulate hepatocytes, sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells via STAT/IRF-1 to produce multiple chemokines.⁴³ IFN- γ and STAT-1 were unchanged in patients with AH compared to controls. Interestingly, hepatic expression of IFN- γ and STAT-1 did not correlate with hepatic expression of CXC chemokines, but with CC chemokines. These data suggest that the interferon-STAT axis may influence the expression of CC chemokines, rather than CXC chemokines, in AH.

Our study has several limitations. First, hepatic gene expression analysis was only carried out in nearly half of the patients. This fact was due to ethical concerns. Gene analysis was just performed when the amount of liver tissue obtained in transjugular biopsies allowed both histological analysis and RNA extraction. And second, the degree of IL-8, Gro- α and

ENA-78 protein expression was assessed semiquantitatively because the staining was observed in both hepatocytes and non-parenchymal cells. This type of pattern does not allow a clear selection of areas with positive staining by the computer analysis.

In conclusion, we found that liver gene expression of ELR⁺ CXC chemokines are overexpressed in patients with AH and correlate with disease severity. These results suggest a potential role for IL-8 and other CXC chemokines in the pathogenesis of AH. The next step would be to investigate whether drugs that interfere with these chemokines (i.e. of CXCR1 and CXCR2 antagonists) have a beneficial effect in rodents with experimental alcoholic steatohepatitis. In a model of ischemia-reperfusion, an IL-8 receptor blocker prevents neutrophil infiltration and attenuates liver injury.⁴⁴ Further studies should confirm if this beneficial effect is also observed in experimentally-induced ALD.

References

1. Pares A, Caballeria J, Bruguera M, et al. Histological course of alcoholic hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage. *J Hepatol* 1986; 2: 33-42.
2. Purohit V, Russo D. Cellular and molecular mechanisms of alcoholic hepatitis: introduction and summary of the symposium. *Alcohol* 2002; 27: 3-6.
3. Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad Med J* 2000; 76: 280-286.
4. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, et al. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978; 75: 193-199.
5. Dominguez M, Rincon D, Abraldes JG, et al. A new scoring system for prognostic stratification of patients with alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2747-2756.
6. Ramaiah SK, Jaeschke H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 757-766.
7. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1467-1476.
8. Taieb J, Mathurin P, Elbim C, et al. Blood neutrophil functions and cytokine release in severe alcoholic hepatitis: effect of corticosteroids. *J Hepatol* 2000; 32: 579-586.
9. Taieb J, Chollet-Martin S, Cohard M, et al. The role of interleukin-10 in severe acute alcoholic hepatitis. *Clin Biochem* 2001; 34: 237-238.
10. Naveau S, Chollet-Martin S, Dharancy S, et al. A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 1390-1397.
11. Boetticher NC, Peine CJ, Kwo P, et al. A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Multicenter Trial of Etanercept in the Treatment of Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* 2008; 135: 1953-1960.
12. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 1-8.
13. Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R, et al. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 139-149.
14. Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 109-118.
15. Maltby J, Wright S, Bird G, Sheron N. Chemokine levels in human liver homogenates: associations between GRO alpha and histopathological evidence of alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1996; 24: 1156-1160.
16. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d1899-914.
17. Bautista AP. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002; 27: 17-21.

18. Bird G. Interleukin-8 in alcoholic liver disease. *Acta Gastroenterol Belg* 1994; 57: 255-259.
19. Ciecko-Michalska I, Szczepanek M, Cibor D, et al. Serum cytokine concentration as prognostic factor in patients with alcoholic liver disease. *Przegl Lek* 2006; 63: 249-252.
20. Hill DB, Marsano LS, McClain CJ. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1993; 18: 576-580.
21. Huang YS, Chan CY, Wu JC, et al. Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J Hepatol* 1996; 24: 377-384.
22. Huang YS, Wu JC, Chang FY, Lee SD. Interleukin-8 and alcoholic liver disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1999; 62: 395-401.
23. Ishii K, Furudera S, Kumashiro R, et al. Role of serum interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 in the severity of alcoholic hepatitis. *Alcohol Alcohol Suppl* 1994; 29: 81-85.
24. Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, et al. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology* 2007; 132: 687-697.
25. Afford SC, Fisher NC, Neil DA, et al. Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* 1998; 186: 82-89.
26. Hasin D. Classification of alcohol use disorders. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 5-17.
27. Bosch J, Garcia-Pagan JC, Berzigotti A, Abraldes JG. Measurement of portal pressure and its role in the management of chronic liver disease. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 348-362.
28. Asselah T, Bieche I, Laurendeau I, et al. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;129:2064-2075.
29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
30. Jimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, et al. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 1997; 26: 1530-1537.
31. Ponnappa BC, Israel Y, Aini M, et al. Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisense oligonucleotides. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 569-577.
32. Saito H, Ishii H. Recent understanding of immunological aspects in alcoholic hepatitis. *Hepatol Res* 2004; 30: 193-198.
33. Siegmund S, Spanagel R, Singer MV. Role of the brain-gut axis in alcohol-related gastrointestinal diseases--what can we learn from new animal models? *J Physiol Pharmacol* 2003; 54 Suppl 4:191-207.

34. Rincon D, Lo IO, Ripoll C, et al. Prognostic value of hepatic venous pressure gradient for in-hospital mortality of patients with severe acute alcoholic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 841-848.
35. Spahr L, Rubbia-Brandt L, Frossard JL, et al. Combination of steroids with infliximab or placebo in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled pilot study. *J Hepatol* 2002; 37: 448-455.
36. Gonzalez-Quintela A, Campos J, Gude F, et al. Serum concentrations of interleukin-8 in relation to different levels of alcohol consumption. *Cytokine* 2007; 38: 54-60.
37. Swiatkowska-Stodulska R, Bakowska A, Drobinska-Jurowiecka A. Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Med Sci Monit* 2006; 12: CR215-CR220.
38. Jaeschke H. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002; 27: 23-27.
39. Bautista AP. Chronic alcohol intoxication primes Kupffer cells and endothelial cells for enhanced CC-chemokine production and concomitantly suppresses phagocytosis and chemotaxis. *Front Biosci* 2002; 7: a117-25.
40. Tsukamoto H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 911-916.
41. Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, et al. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2006; 169: 2042-2053.
42. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, et al. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 205-219.
43. Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. IFN-gamma/STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1044-G1052.
44. Cavalieri B, Mosca M, Ramadori P, et al. Neutrophil recruitment in the reperfused-injured rat liver was effectively attenuated by repertaxin, a novel allosteric noncompetitive inhibitor of CXCL8 receptors: a therapeutic approach for the treatment of post-ischemic hepatic syndromes. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18: 475-486.

Acknowledgements

We thank Cristina Millán and Elena Juez for their excellent technical support, the personnel of the Liver Hemodynamic Unit, Xavier Forns and Stella Martínez for collaboration in obtaining the samples and Roser Casamitjana for technical support. This work is supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Dirección General de Investigación (SAF 2005-06245), from the Instituto de Salud Carlos III (FIS 05/050567, FIS PI 060085 and PI 080237) and from European Community (V2006-CE036644). Marlene Dominguez had a grant from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and from the Fundación Banco Bilbao Vizcaya Argentaria (FBBVA). Montserrat Moreno had a grant from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

Figure Legends

Figure 1. A-D. Identification of components of CXC chemokine family that correlate with 90-day mortality in patients with alcoholic hepatitis. Gro- γ , epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78), granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2) and interleukin-8 (IL-8) hepatic gene expression was higher in patients who died at 90-days (* $p < 0.05$). **E.** Kaplan-Meier curve showing 90-day survival according to IL-8 gene expression (fold expression respect to controls). A value of 9.33 (fold expression) was identified as the cut-off value with better sensitivity and specificity to define patients with low and high IL-8 gene expression. **F.** Kaplan-Meier curve showing 90-day survival according to ENA-78 gene expression (fold-expression respect to controls). A value of 88 (fold expression) was identified as the cut-off value with better sensitivity and specificity to define patients with low and high ENA-78 gene expression.

Figure 2. A and B. Representative photomicrographs of livers with alcoholic hepatitis (AH) stained with anti-CD15 (neutrophils) and anti-CD3 (lymphocytes), respectively. Magnification 200x. **C-F.** Identification of components of CXC chemokines that correlated with the degree of neutrophil infiltration in livers with AH. The median value of 52 cells/high power field was used as the cut-off value to define patients with low and high hepatic neutrophil infiltration. Interleukin-8 (IL-8), epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78), Gro- γ and Gro- α hepatic gene expression was higher in patients who had severe neutrophil infiltration (* $p < 0.05$).

Figure 3. Identification of components of CXC chemokines that correlate with severe portal hypertension. The median value of 20 mmHg of hepatic venous portal gradient (HVPG) was used as the cut-off value to define patients with lower and higher degree of portal hypertension. **A:** Gro- γ , **B:** epithelial-derived neutrophil-activating peptide (ENA-78) and **C:** interleukin 8 (IL-8) hepatic gene expression was higher in patients with more severe portal hypertension (* $p < 0.05$).

Figure 4. A-B. Representative photomicrographs of livers with alcoholic hepatitis (AH) with none/mild (**A**) and moderate/marked (**B**) staining with anti-interleukin 8 (200x magnification). **C.** Kaplan-Meier curve showing 90-day survival according to IL-8 liver protein expression. **D-E.** Representative photomicrographs of livers with alcoholic hepatitis (AH) with none/mild (**D**) and moderate/marked (**E**) staining with anti-ENA 78 (200x magnification). **F.** Kaplan-Meier curve showing 90-day survival according to ENA-78 liver protein expression. Patients with moderate/marked IL-8 and ENA-78 protein expression had higher 90-day mortality.

Table 1. Clinical, Analytical and Hepatic Hemodynamic Characteristics of Patients with Alcoholic Hepatitis (AH) Included in the Study.

Variables	Mean \pm SE or Percentage
Age (years)	49.10 \pm 0.8
Male (%)	66.7
Maddrey's DF	56.6 \pm 3.65
MELD score	22 \pm 0.7
ABIC score	7.69 \pm 0.15
Severe AH (%)	75
Alcohol intake (gr/d)	118 \pm 6.44
90-day mortality (%)	21.9
Glucose (mg/dl)	114 \pm 4.7
Creatinine (mg/dl)	1.09 \pm 0.11
Sodium (mEq/L)	133 \pm 0.51
AST (U/L)	152 \pm 9.9
ALT (U/L)	62 \pm 4.42
GGT (U/L)	629 \pm 81.09
Bilirubin (mg/dl)	12.6 \pm 0.9
Albumin (mg/dl)	26.9 \pm 0.5
Hematocrit (%)	31.55 \pm 0.64
Platelet count ($\times 10^9$)	139 \pm 9
Leukocytes count ($\times 10^9$ /L)	10.4 \pm 0.5
Neutrophils count (%)	74 \pm 0.14
INR	1.80 \pm 0.05
HVPG (mmHg)*	19.37 \pm 0.6

*Hepatic venous portal gradient.

Table 2. Histological Characteristics of Patients with Alcoholic Hepatitis (AH) Included in the Study.

Variables	Mean \pm SE or Percentage
Cirrhosis (%)	59.6
Lobular fibrosis	
Fibrosis in zone 3 (%)	23.8
Fibrosis in zone 2 and 3 (%)	40.6
Panlobular fibrosis (%)	33.7
Steatosis (%)	50 \pm 2.69
Steatosis type	
Macrovesicular (%)	22.2
Mixte (%)	76.8
Steatosis distribution	
Focal (%)	8.1
Difuse (%)	91.9
Inflammatory grade	
Mild (%)	68.3
Moderate (%)	8.9
Severe (%)	22.8
Ballooning	
Mild (%)	41
Marked (%)	59
Cholestasis	
Absent (%)	31.4
Canallicular (%)	26.5
Mild hepatocellular (%)	10.8
Severe hepatocellular (%)	2
Canallicular+hepatocellular (%)	29.4
CD3+ cells/field	69 \pm 4.5
CD15+ cells/field	74 \pm 6.5
TUNEL+ cells/field	6 \pm 0.6
IL-8-staining	
None/mild (%)	61
Moderate/marked (%)	39

ACCEPTED

Table 3. Hepatic Gene Expression of CXC Chemokine Family in Patients with Alcoholic Hepatitis (AH) vs. Controls.

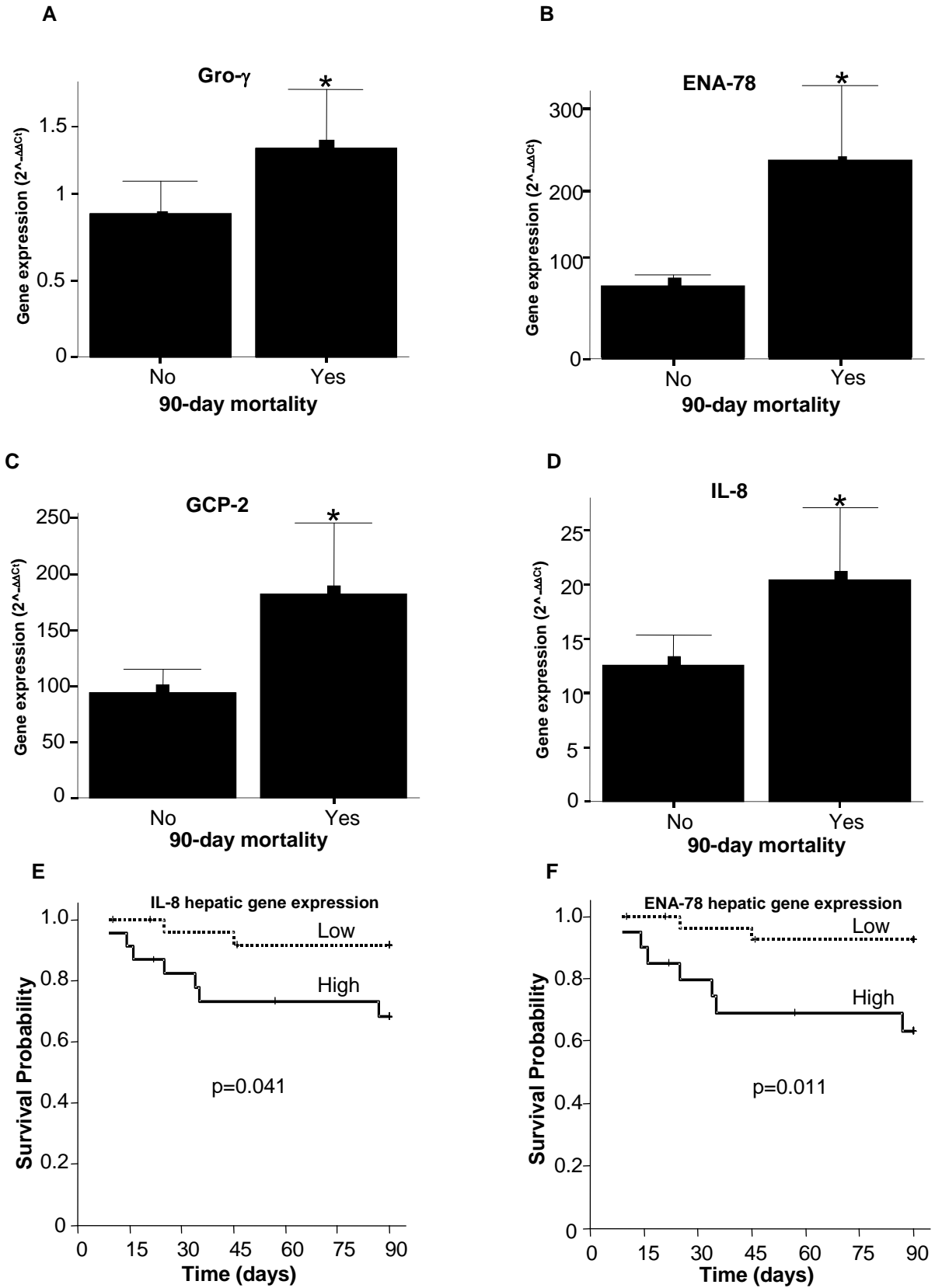
Genes	NCBI number	Fold (Mean \pm SE) <i>AH vs Controls</i>	p
Down-regulated			
Gro-Beta (CXCL2)	Hs00236966_m1	0.17 \pm 0.06	0.00001
Up-regulated			
IL-8 (CXCL8)	Hs00174103_m1	14.02 \pm 2.58	0.00009
ENA-78 (CXCL5)	Hs00171085_m1	112.50 \pm 21.29	0.000004
Gro-alpha (CXCL1)	Hs00236937_m1	762.76 \pm 133.95	0.00001
GCP-2 (CXCL6)	Hs00237017_m1	110.21 \pm 21.31	0.00001
PF4 (CXCL4)	Hs00236998_m1	47.32 \pm 16.38	0.00005
γ -IP10 (CXCL10)	Hs00171042_m1	7.25 \pm 3.31	0.022
Unchanged			
PPBP (CXCL7)	Hs00234077_m1	6.73 \pm 2.30	0.37
Gro-gamma (CXCL3)	Hs00171061_m1	1.03 \pm 0.19	0.69
IL8RA (CXCR1)	Hs00174146_m1	0.91 \pm 0.22	0.068
IL8RB (CXCR2)	Hs00174304_m1	1.12 \pm 0.25	0.131

IL-8, interleukin-8; ENA-78, epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78; GCP-2, granulocyte chemotactic protein 2; PF4, platelet factor 4; γ -IP10: gamma interferon-induced protein 10; PPBP, pro-platelet basic protein; IL8RA, IL-8 receptor alpha, IL8RB, IL 8 receptor beta.

Table 4. Factors Associated with 90-day Mortality in the Univariate and Multivariate Analysis in the Whole Series of Patients (n =105).

Variables	<i>90-day mortality</i>		
	Hazard ratio	95% CI	p
Univariate Analysis			
HVPG (mmHg)	1.08	1.01-1.15	0.035
IL-8 protein expression (moderate/marked)	2.11	0.91-4.89	0.081
ENA-78 protein expression (moderate/marked)	3.14	1.00-9.95	0.049
Cholestasis	3.49	1.04-11.75	0.044
Steatosis	0.98	0.96-0.99	0.018
Multivariate Analysis			
IL-8 protein expression (moderate/marked)	2.9	1.21-6.99	0.017
Cholestasis	5.74	1.47-22.44	0.012
HVPG (mmHg)	1.12	1.04-1.22	0.004

Figure 1



Patients at risk

Low: 26 23 23 21 21 21 20
High: 23 21 18 18 17 17 13

Patients at risk

Low: 29 29 26 25 24 24 23
High: 20 18 15 13 12 12 10

Figure 2

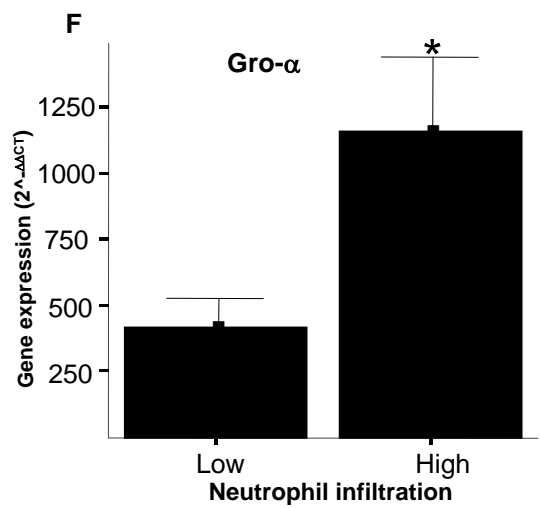
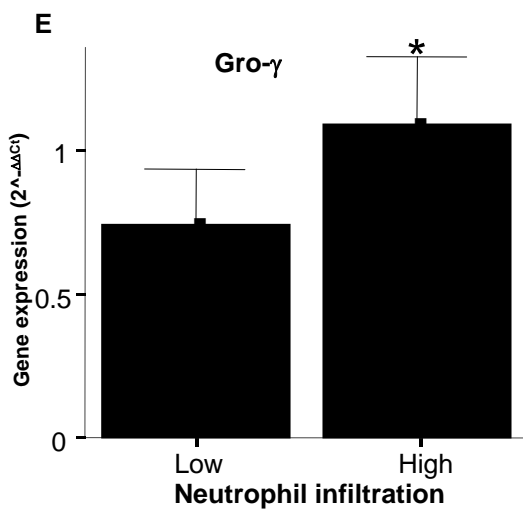
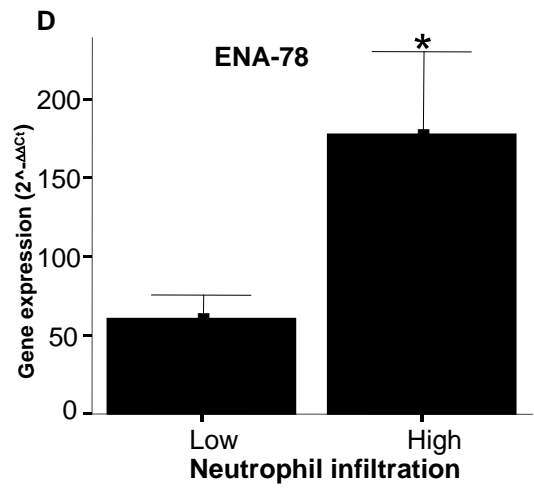
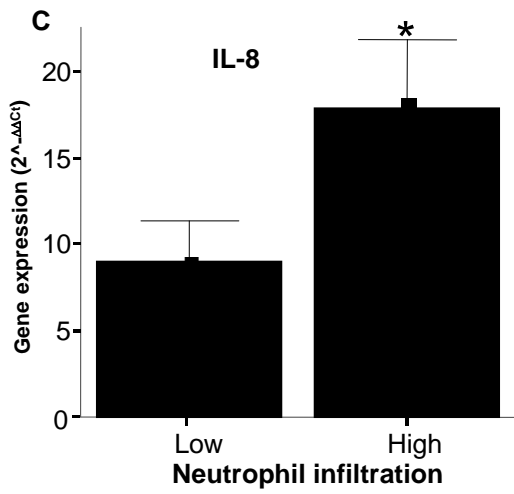
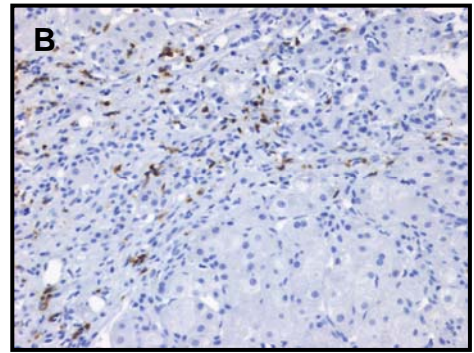
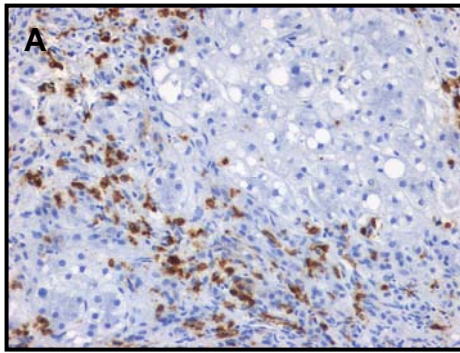


Figure 3

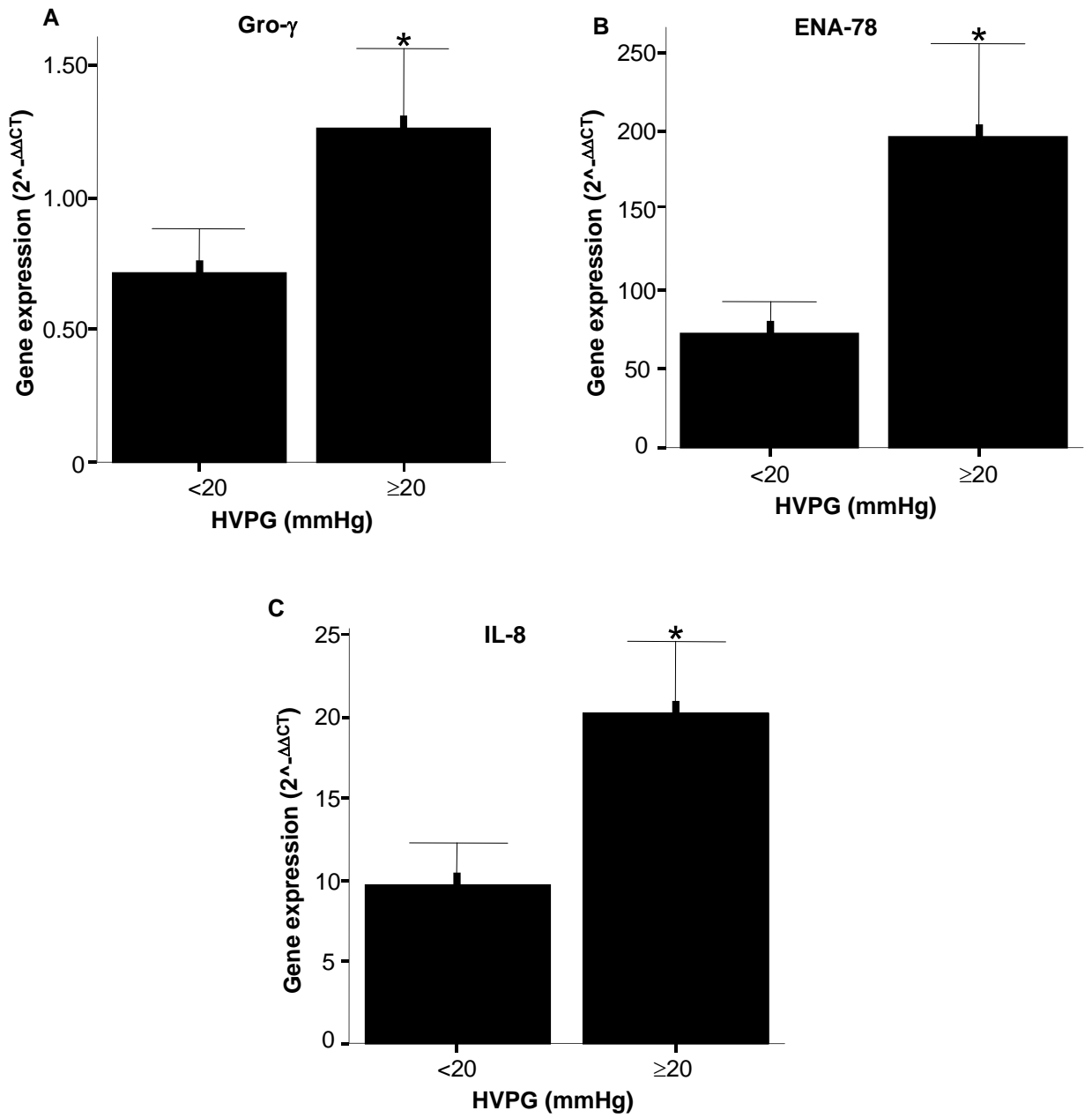
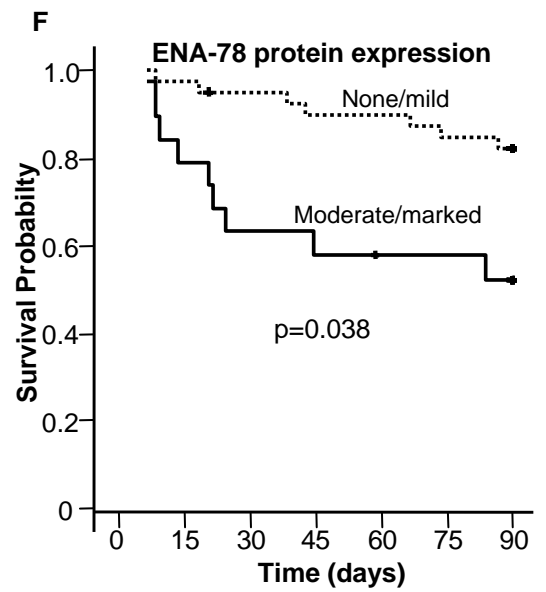
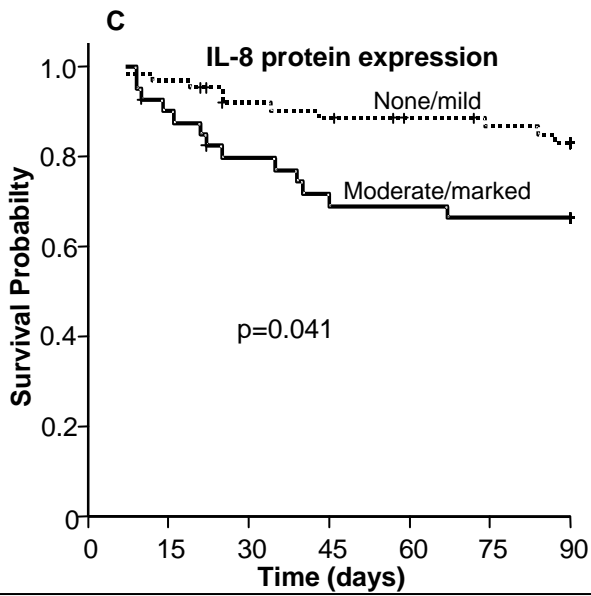
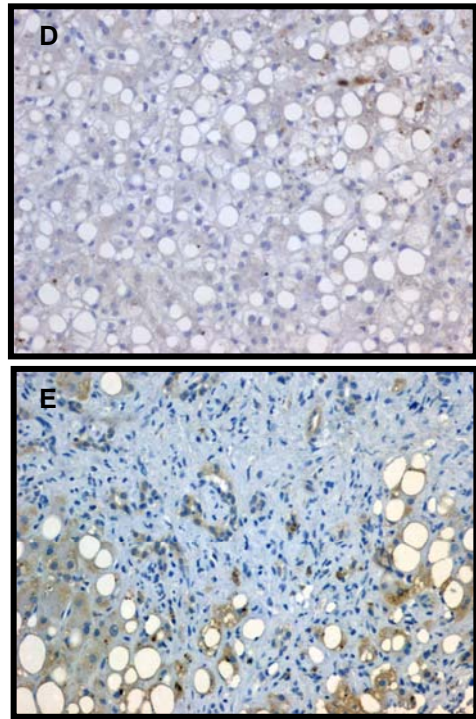
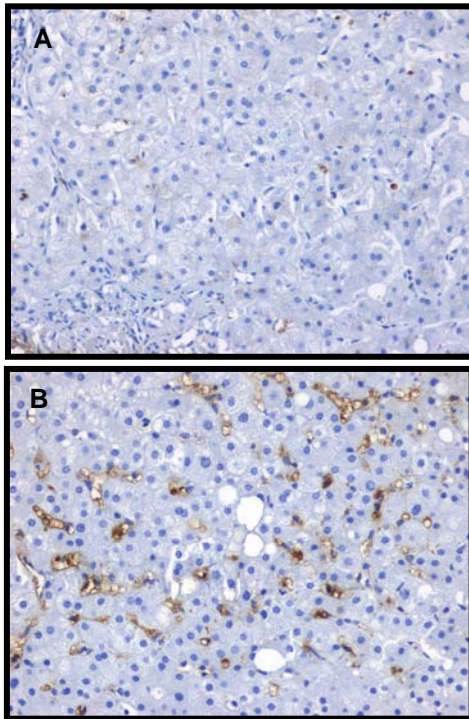


Figure 4



Patients at risk							
None/mild	64	63	59	56	54	52	48
Moderate/ marked	41	37	33	29	29	28	27

Patients at risk							
None/mild	64	64	62	60	60	58	56
Moderate/ marked	41	37	34	33	31	31	28



Montseny, 2006

DISCUSIÓN

Los trabajos incluidos en esta tesis se han centrado principalmente en el estudio de la HA en humanos. Por un lado se ha evaluado el valor combinado de parámetros clínicos, analíticos, histológicos y hemodinámicos hepáticos para generar un sistema de estratificación pronóstica de estos pacientes y por el otro se ha estudiado el papel de las quimiocinas CXC en la HA y su impacto sobre el pronóstico y la gravedad de la enfermedad.

Estudio 1:

La HA es una enfermedad que tiene una elevada mortalidad a corto plazo en pacientes con formas graves de la enfermedad y que no dispone de tratamientos completamente efectivos que mejoren la supervivencia de estos pacientes. La estratificación pronóstica de pacientes con HA puede ayudar a mejorar el manejo clínico así como también al diseño de ensayos clínicos terapéuticos.

En los últimos años varios estudios han investigado la utilidad de diferentes índices predictivos de mortalidad a corto plazo en pacientes con HA [29, 57, 69-71, 73, 74, 114, 115]. La mayoría de estos estudios incluyen parámetros no invasivos (demográficos, clínicos y analíticos), pero se desconoce el valor pronóstico de parámetros histológicos y hemodinámicos hepáticos. En el primer estudio se incluyó parámetros tanto invasivos como no invasivos y encontramos que las variables histológicas como daño hepatocelular, esteatosis, infiltrado inflamatorio y fibrosis hepática son importantes para el diagnóstico de HA pero no tienen impacto sobre el pronóstico de los pacientes con HA. Estos hallazgos coinciden con otros publicados previamente en el que los parámetros histológicos como la presencia y la gravedad de la esteatosis macrovesicular o microvesicular, infiltrado inflamatorio, balonamiento

de hepatocitos, fibrosis, hialina de Mallory o la combinación de características histológicas no se asocian con la supervivencia de pacientes con EHA [62].

La FD de Maddrey ha sido el índice más ampliamente utilizado desde hace más de tres décadas cuando fue descrita por primera vez [75]. Este índice permite diferenciar formas graves de no graves de la enfermedad utilizando un valor de corte de 32. Pacientes con HA grave tienen mayor riesgo de muerte a corto plazo y son los que se benefician de tratamiento corticosteroideo. Sin embargo, resultados previos sugieren que este índice no permite una correcta estratificación pronóstica de los pacientes (65). En el primer estudio encontramos que el 29% de los pacientes con HA no grave definido como aquellos pacientes que tenían una FD de Maddrey < 32 , fallecieron dentro de los 90 días del episodio de HA. Estos pacientes tenían un índice ABIC $> 6,71$. Estos datos sugieren que nuestro índice tiene mejor exactitud para identificar pacientes con peor pronóstico y que por tanto necesitan una estrategia terapéutica más agresiva.

La principal diferencia del índice ABIC comparado con la FD de Maddrey es que incluye la edad y la creatinina sérica. La edad y parámetros de función hepática y renal tienen un mayor impacto sobre la supervivencia de pacientes con HA. Estos hallazgos coinciden con los encontrados en estudios previos donde la edad, el tiempo de protrombina, la bilirrubina y la creatinina séricas son factores predictivos de mortalidad en pacientes con HA [65, 69-71, 114, 116]. Es posible que con la edad ocurra una disminución del metabolismo del alcohol y que por otro lado los efectos del etanol sobre los tejidos sean dependientes de una mayor sensibilidad de los tejidos blancos a las altas concentraciones de alcohol en sangre. Estudios experimentales también han encontrado que la toxicidad aguda del alcohol es letal en ratas de mayor edad [117].

Estudios previos han encontrado que el índice de MELD, inicialmente desarrollado para predecir supervivencia en pacientes con cirrosis e hipertensión portal [66], es un buen predictor de supervivencia a corto plazo en pacientes con HA [69-71]. Sin embargo, algunos de estos estudios son principalmente retrospectivos e incluyen pacientes con HA sin confirmación histológica, con infección por virus de la hepatitis C o B o con toxicidad por drogas. Además, los valores de corte del índice de MELD para identificar pacientes con mayor gravedad de la enfermedad son variables según los diferentes estudios. Nosotros demostramos que el índice ABIC es un predictor independiente de mortalidad a 90 días a diferencia de los otros índices utilizados previamente. El índice ABIC incluye parámetros similares al MELD, excepto la edad. Sin embargo, el mayor valor predictivo de nuestro índice no es sólo el agregado por la edad sino por el impacto que tiene cada variable en la ecuación.

El índice de Glasgow descrito por Forrest *et al.* predice mortalidad a corto plazo en pacientes con HA [114]. Incluye 5 variables en forma categorizada: edad, bilirrubina sérica, urea, la razón del tiempo de protrombina y el conteo de leucocitos en sangre periférica. En nuestro estudio encontramos que el índice ABIC es mejor predictor de mortalidad a corto plazo que el índice de Glasgow y además permite una mejor estratificación de los pacientes de acuerdo al riesgo de muerte. El índice ABIC incluye parámetros fácilmente obtenidos al ingreso hospitalario permitiendo una rápida identificación del pronóstico de los pacientes con HA que ayuda a la decisión terapéutica. Este índice permite identificar pacientes con buen pronóstico, los cuales pueden ser manejados con tratamiento estándar como soporte nutricional y apoyo psicológico para la abstinencia alcohólica, mientras que pacientes con alto riesgo de muerte podrían beneficiarse de nuevas intervenciones terapéuticas. Probablemente, pacientes con riesgo intermedio de muerte se beneficien de tratamiento farmacológico estándar, como son los corticosteroides y/o pentoxifilina.

Actualmente los corticosteroides son el tratamiento estándar de los pacientes con HA grave. Existen múltiples ensayos clínicos y meta-análisis que han evaluado su uso en HA [56, 63, 64, 80, 89, 90, 94, 96, 118-127]. Sin embargo, los resultados son controvertidos. En el análisis multivariado del primer estudio encontramos que el tratamiento con corticosteroides no está asociado con el pronóstico de los pacientes con HA. Estos resultados están acorde con el último meta-análisis publicado sobre el uso de corticosteroides en HA, el cual incluyó 15 ensayos clínicos y 721 pacientes. La mayoría de estos ensayos clínicos muestran una alta heterogeneidad de la muestra y por tanto no existe una clara evidencia sobre el efecto beneficioso del uso de corticosteroides en pacientes con HA grave [100].

El modelo de Lille ha sido descrito recientemente, mostrando una excelente exactitud para predecir respuesta a tratamiento corticosteroideo luego de 7 días de tratamiento. Pacientes con un índice $> 0,45$ después de una semana de tratamiento corticosteroideo son no respondedores a tratamiento. En un análisis realizado en nuestro estudio, incluyendo sólo pacientes con HA grave tratados con corticosteroides, encontramos que el índice ABIC obtenido con parámetros al 7º día de ingreso tiene mejor exactitud que el modelo de Lille para predecir mortalidad a 6 meses. Esto indica que pacientes con HA tratados con corticosteroides que tengan un índice ABIC al 7º día ≥ 9 tienen una mortalidad a los 6 meses del 88% mientras que pacientes con un índice < 9 tienen una mortalidad de 40%.

Otro resultado importante del primer estudio fue que el desarrollo de insuficiencia renal intrahospitalaria en pacientes con HA incrementa cinco veces el riesgo de muerte a corto plazo. Pacientes con bajo riesgo de muerte (índice ABIC $< 6,71$) no desarrollaron insuficiencia renal durante el ingreso hospitalario. Este hallazgo indica que pacientes con alto riesgo de muerte (índice ABIC ≥ 9) requieren medidas

terapéuticas para evitar el desarrollo de insuficiencia renal, por ejemplo, evitar el uso de drogas nefrotóxicas, expansión de volumen plasmático y prevención de infecciones bacterianas que puedan desencadenar síndrome hepatorenal.

Varios estudios han encontrado que el desarrollo de complicaciones como encefalopatía hepática o infecciones bacterianas son predictoras independientes de mortalidad en pacientes con HA grave [57, 128, 129]. Nuestros resultados sugieren que estas complicaciones están asociadas con mortalidad a corto plazo, pero no son predictoras independientes del pronóstico de estos pacientes a diferencia del desarrollo de insuficiencia renal intrahospitalaria en pacientes con HA grave y no grave.

Otro factor asociado con mortalidad a corto plazo es el gradiente de presión venosa portal. En un estudio publicado en 2007 encontraron que el GPVH es un predictor independiente de mortalidad intrahospitalaria en pacientes con HA grave. Pacientes con un GPVH > 22 mmHg tienen mayor riesgo de muerte independientemente de la presencia de cirrosis [57]. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que el gradiente de presión portal es un factor predictivo en pacientes sin cirrosis hepática establecida. Esto podría explicarse por el hecho que el grado de hipertensión portal en pacientes sin cirrosis es un reflejo del mayor daño necroinflamatorio que tienen estos pacientes y no del grado de fibrosis hepática.

En resumen este estudio demuestra que la edad y parámetros de función renal (creatinina sérica) y hepática (bilirrubina y tiempo de protrombina) son predictores independientes de mortalidad en pacientes con HA. El índice ABIC, el cual incluye estos parámetros fácilmente obtenibles al ingreso hospitalario, permite la

estratificación pronóstica de los pacientes con HA ayudando a identificar a pacientes con bajo, intermedio y alto riesgo de muerte con una excelente exactitud.

Estudio 2:

En el segundo estudio se investigó el papel patogénico de la familia de las quimiocinas CXC en pacientes con HA confirmada histológicamente. Se evaluó el impacto de estas quimiocinas sobre el pronóstico y la gravedad de la enfermedad. Para ello se realizó varias aproximaciones: 1- Se determinó la expresión génica hepática de 11 quimiocinas de esta familia y de 2 quimiocinas CC en pacientes con HA comparado con fragmentos de hígados normales. 2- Se evaluó la expresión proteica hepática de tres quimiocinas CXC: IL-8, Gro- α y ENA-78 en los pacientes con HA. 3- Se determinó los niveles séricos de IL-8 y Gro- α en pacientes con HA.

En este estudio encontramos aumentada la expresión génica hepática de seis quimiocinas CXC en pacientes con HA. Sin embargo, sólo la expresión de quimiocinas CXC ELR+, atrayentes de neutrófilos, se asoció con mortalidad a corto plazo. También encontramos que la expresión proteica hepática de IL-8 y de ENA-78 son predictores de mortalidad en estos pacientes. Estos hallazgos están en relación con otros estudios que indican que quimiocinas atrayentes de neutrófilos como Gro- α está incrementada en pacientes con HA [50, 130]. Las quimiocinas CXC ELR+ tienen propiedades biológicas que incluyen quimiotaxis de neutrófilos, fibrogénesis y muerte celular, por tanto estos resultados sugieren un papel potencial de esta subfamilia de citocinas en la patogénesis de la HA.

El metabolismo del etanol en los hepatocitos puede influenciar la producción de quimiocinas CXC. Estudios que usaron células humanas de hepatoma HepG2 demostraron que el acetaldehído incrementa la síntesis de IL-8. El metabolismo del etanol en los hepatocitos induce estrés oxidativo y este puede ser un mecanismo de interacción entre la ingesta de alcohol y la transcripción de quimiocinas por los hepatocitos. De hecho, la ingesta elevada de etanol dispara la cascada inflamatoria en los hepatocitos y amplifica la producción de quimiocinas CXC por estas células [50].

La mayoría de los estudios que investigan mecanismos patogénicos en EHA provienen de modelos experimentales en roedores, los cuales no representan exactamente lo ocurrido en el humano [131-133]. Se ha encontrado que la expresión génica de TNF- α se encuentra incrementada en ratas alimentadas con alcohol y que el tratamiento con anticuerpos contra TNF- α mejora la inflamación y la necrosis hepática en estas ratas [131, 134, 135]. Sin embargo, estudios en humanos con anti-TNF- α (infiximab o etanercept) han mostrado una mortalidad elevada asociada con infecciones graves por lo que se han tenido que suspender estos ensayos clínicos [89-92].

Otro resultado importante es que la expresión génica hepática de IL-8 y de otras quimiocinas CXC ELR+ se correlaciona con el grado de hipertensión portal. Pacientes con marcada hipertensión portal (GPVH >20 mmHg) tienen incrementada la expresión hepática de IL-8, Gro- γ y ENA-78. Es frecuente que pacientes con esta enfermedad tengan hipertensión portal acentuada que lleva a complicaciones mayores como ascitis, sangrado variceal y encefalopatía hepática y además pueda favorecer la aparición de infecciones bacterianas. Otro hallazgo con posible relevancia clínica es el GPVH como predictor de mortalidad a 90 días. Nuestros resultados concuerdan

con el estudio de Rincón *et al.* que demostró la correlación entre el GPVH y la mortalidad intrahospitalaria en pacientes con HA grave tratados con corticosteroides [57]. Es posible que la producción incrementada de quimiocinas en estos pacientes contribuya al aumento de la presión portal a través de actuar sobre las células estrelladas hepáticas regulando su contractilidad e incrementando la síntesis de colágeno, llevando finalmente a fibrosis y al aumento de la resistencia intrahepática [45].

La HA se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio predominantemente de neutrófilos. Nosotros encontramos la presencia de infiltrado inflamatorio heterogéneo en la biopsia hepática de estos pacientes. El grado de infiltración linfocitaria no se asoció con el pronóstico o gravedad de la enfermedad. Sin embargo, pacientes con HA grave tenían un mayor grado de infiltración neutrofílica en el tejido hepático. Estos resultados indican que los neutrófilos parecen contribuir a la gravedad de la enfermedad. Pacientes con mayor grado de infiltración por neutrófilos tienen sobre-expresión de 3 genes de la subfamilia de quimiocinas CXC ELR+ (IL-8, GCP-2 y Gro- γ), sugiriendo que estos mediadores contribuyen a la quimiotaxis de neutrófilos en el tejido hepático dañado. Estudios experimentales han demostrado que el etanol produce un incremento de la peroxidación lipídica por incremento de la endotoxemia, lo que lleva a una activación del factor de transcripción NF- κ B resultando en cambios necroinflamatorios en el hígado de ratas alimentadas con alcohol. El NF- κ B juega un papel importante en regular la transcripción de genes pro-inflamatorios como las quimiocinas y que la activación de este factor de transcripción, incrementa la expresión de quimiocinas CXC y CC [136].

Un hallazgo interesante en este estudio fue que los pacientes con HA tenían una mayor sobre-expresión hepática de Gro- α que de IL-8. Sin embargo, a diferencia de

la expresión hepática de IL-8, la expresión de Gro- α no se asoció con el pronóstico o gravedad de la enfermedad. La quimiocina Gro- α tiene propiedades biológicas similares a la IL-8, manteniendo aproximadamente el 75% de su actividad quimiotáctica, pero es sólo el 15% tan activa como la IL-8 para generar ROS [50]. Esto podría explicar porqué Gro- α a pesar de estar importantemente sobre-expresada en los pacientes con HA no tiene impacto sobre la supervivencia o gravedad de la enfermedad.

En este estudio encontramos que los pacientes con HA tienen niveles séricos significativamente elevados de IL-8 y Gro- α . Estos resultados están en relación con estudios publicados previamente [137]. Sin embargo, a diferencia de Swiatkowska-Stodulska *et al.*, no observamos correlación entre los niveles séricos de estas quimiocinas con el pronóstico o la gravedad de la enfermedad. Estos resultados sugieren que los niveles séricos de estas quimiocinas no se correlacionan con su expresión hepática. Probablemente, la expresión hepática de IL-8 más que los niveles séricos juega un papel patogénico en la HA.

También evaluamos la expresión génica hepática de dos quimiocinas CC (MCP-1 y RANTES). MCP-1 está sobre-expresado en el hígado de pacientes con HA en comparación con los controles. Sin embargo, RANTES no está diferencialmente expresado en estos pacientes. La expresión hepática de MCP-1 no se asoció con el pronóstico o la gravedad de la enfermedad. Estudios previos han encontrado que niveles séricos de MCP-1 están elevados en pacientes con HA en comparación con pacientes con cirrosis o con controles sanos y que se asocia con la gravedad histológica de la enfermedad [46, 138]. Las quimiocinas CC son atrayentes de células mononucleares (linfocitos y monocitos) y el prototipo principal es el MCP-1. Por tanto, es de esperar que si el infiltrado linfocitario en el hígado no se asocia con gravedad o

pronóstico de la HA tampoco se asocia la expresión de quimiocinas CC atrayentes de linfocitos.

Finalmente, evaluamos la expresión génica hepática de IFN- γ y STAT-1, debido a que en estudios previos se ha encontrado que los niveles séricos de IFN- γ se encuentran elevados en pacientes con HA [139]. Estudios experimentales han encontrado que la vía IFN- γ /STAT-1 actúa como señal pro-inflamatoria en hepatitis mediada por células T estimulando a los hepatocitos para la producción de quimiocinas CXC y CC. La actividad del IFN- γ es mediada por la activación de la vía de señalización de JAK/STAT. STAT 1 se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes inflamatorios [140]. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que IFN- γ y STAT-1 no están diferencialmente expresados en pacientes con HA en comparación con los controles. La expresión hepática de estos genes se correlacionó con la expresión hepática de quimiocinas CC, pero no con la expresión hepática de quimiocinas CXC. Estos datos sugieren que este eje IFN/STAT puede influenciar la expresión de quimiocinas CC más que de quimiocinas CXC en pacientes con HA.

En resumen el segundo estudio demuestra que la expresión génica hepática de quimiocinas CXC ELR+ está sobre-regulada en pacientes con HA y se correlaciona con el pronóstico y la gravedad de la enfermedad. Estos resultados sugieren un papel potencial de la IL-8 y otras quimiocinas CXC en la patogénesis de la HA.



Navidad, 2008

CONCLUSIONES

Estudio 1:

- La edad y los parámetros indicativos de función renal y hepática son predictores independientes de supervivencia a corto y largo plazo en pacientes con HA teniendo un mejor valor predictivo que los parámetros histológicos o el gradiente de presión portal.
- El índice ABIC tiene mejor exactitud pronóstica que la FD de Maddrey, el índice de MELD o el índice de Glasgow en pacientes con HA confirmada histológicamente.
- El índice ABIC permite la estratificación del riesgo de muerte a 90 días y al año en pacientes con HA utilizando valores de corte de 6,71 y 9. Esta estratificación pronóstica permite identificar los pacientes con bajo, intermedio y alto riesgo de muerte, contribuyendo a optimizar las decisiones terapéuticas.
- Pacientes con bajo riesgo de muerte (índice ABIC < 6,71) tienen una supervivencia del 100%, pacientes con riesgo intermedio (índice ABIC= 6,71-8,99) tienen una supervivencia de 70% y pacientes con riesgo elevado (índice ABIC ≥ 9.0) tienen una supervivencia de 25% a los 90 días del ingreso hospitalario.
- El desarrollo de insuficiencia renal intrahospitalaria incrementa casi cinco veces el riesgo de muerte a 90 días en pacientes con HA.

Estudio 2:

- Los genes que codifican quimiocinas CXC, incluyendo la IL-8, el ENA-78, el Gro- α , la GCP-2, el PF4 y el γ -IP10 están sobre-expresados en hígados de pacientes con HA en comparación con hígados normales.
- La sobre-expresión hepática de quimiocinas CXC ELR+ como la IL-8 y la ENA-78, se correlaciona con el pronóstico a corto plazo y con la gravedad de la HA, lo que sugiere un papel patogénico de esta subfamilia de quimiocinas en la patogénesis de la HA.
- La expresión génica hepática de algunas quimiocinas CXC ELR+ se asocia con un mayor grado de hipertensión portal en pacientes con HA.
- La expresión génica hepática de quimiocinas CXC ELR+, que son las atrayentes de neutrófilos, se asocia con una mayor infiltración neutrofílica en el hígado de pacientes con HA.
- La expresión génica hepática de MCP-1, el principal representante de las quimiocinas CC, está elevada en pacientes con HA pero no se asocia con el pronóstico ni con la gravedad de la enfermedad.
- La expresión génica hepática de IFN- γ y STAT-1 no está incrementada en pacientes con HA en comparación con los controles.



Hospital Clínic, Barcelona

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

1. Levitsky J, Mailliard ME. Diagnosis and therapy of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 2004; 24(3):233-247.
2. Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4(1):24-34.
3. Tome S, Lucey MR. Current management of alcoholic liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2003; 19(7):707.
4. Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad Med J* 2000; 76(895):280-286.
5. McCullough AJ, O'Connor JF. Alcoholic liver disease: proposed recommendations for the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(11):2022-2036.
6. Mandayam S, Jamal MM, Morgan TR. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 2004; 24(3):217-232.
7. Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M, *et al.* Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. *Gut* 1997; 41(6):845-850.
8. Menon KV, Gores GJ, Shah VH. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic liver disease. *Mayo Clin Proc* 2001; 76(10):1021-1029.
9. Hasin D. Classification of alcohol use disorders. *Alcohol Res Health* 2003; 27(1):5-17.
10. Arteel G, Marsano L, Mendez C, Bentley F, McClain CJ. Advances in alcoholic liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17(4):625-647.
11. Safdar K, Schiff ER. Alcohol and hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004; 24(3):305-315.
12. Haber PS, Warner R, Seth D, Gorrell MD, McCaughan GW. Pathogenesis and management of alcoholic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18(12):1332-1344.
13. Saunders JB, Wodak AD, Morgan-Capner P, White YS, Portmann B, Davis M, *et al.* Importance of markers of hepatitis B virus in alcoholic liver disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983; 286(6381):1851-1854.
14. Siegmund SV, Haas S, Singer MV. Animal models and their results in gastrointestinal alcohol research. *Dig Dis* 2005; 23(3-4):181-194.
15. Zakhari S, Li TK. Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology* 2007; 46(6):2032-2039.
16. Thiele GM, Freeman TL, Klassen LW. Immunologic mechanisms of alcoholic liver injury. *Semin Liver Dis* 2004; 24(3):273-287.

17. Tsukamoto H, Lu SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J* 2001; 15(8):1335-1349.
18. Tsukamoto H. Conceptual importance of identifying alcoholic liver disease as a lifestyle disease. *J Gastroenterol* 2007; 42(8):603-609.
19. Fernandez-Checa JC, Colell A, Garcia-Ruiz C. S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002; 27(3):179-183.
20. Bautista AP. Impact of alcohol on the ability of Kupffer cells to produce chemokines and its role in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15(4):349-356.
21. Leevy CB, Elbeshbeshy HA. Immunology of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 2005; 9(1):55-66.
22. Duryee MJ, Klassen LW, Thiele GM. Immunological response in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13(37):4938-4946.
23. Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005; 11(11):RA337-RA345.
24. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343(20):1467-1476.
25. McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB, Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(3):G497-G502.
26. Sougioultzis S, Dalakas E, Hayes PC, Plevris JN. Alcoholic hepatitis: from pathogenesis to treatment. *Curr Med Res Opin* 2005; 21(9):1337-1346.
27. Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003; 37(3):493-503.
28. O'Brien CP. The CAGE questionnaire for detection of alcoholism: a remarkably useful but simple tool. *JAMA* 2008; 300(17):2054-2056.
29. Castera L, Hartmann DJ, Chapel F, Guettier C, Mall F, Lons T, *et al.* Serum laminin and type IV collagen are accurate markers of histologically severe alcoholic hepatitis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 32(3):412-418.
30. Poynard T, Morra R, Halfon P, Castera L, Ratziu V, Imbert-Bismut F, *et al.* Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterol* 2007; 7:40.:40.
31. Shaheen AA, Wan AF, Myers RP. FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(11):2589-2600.
32. Pemberton PW, Smith A, Warnes TW. Non-invasive monitoring of oxidant stress in alcoholic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40(9):1102-1108.

33. Williams R. The pervading influence of alcoholic liver disease in hepatology. *Alcohol Alcohol* 2008; 43(4):393-397.
34. Ceccanti M, Attili A, Balducci G, Attilia F, Giacomelli S, Rotondo C, *et al.* Acute alcoholic hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40(9):833-841.
35. Rongey C, Kaplowitz N. Current concepts and controversies in the treatment of alcoholic hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12(43):6909-6921.
36. Afford SC, Fisher NC, Neil DA, Fear J, Brun P, Hubscher SG, *et al.* - Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* 1998(1):1-9.
37. Taieb J, Mathurin P, Elbim C, Cluzel P, Arce-Vicioso M, Bernard B, *et al.* Blood neutrophil functions and cytokine release in severe alcoholic hepatitis: effect of corticosteroids. *J Hepatol* 2000; 32(4):579-586.
38. Neuman MG, Katz GG, Malkiewicz IM, Mathurin P, Tsukamoto H, Adachi M, *et al.* Alcoholic liver injury and apoptosis--synopsis of the symposium held at ESBRA 2001: 8th Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Paris, September 16, 2001. *Alcohol* 2002; 28(2):117-128.
39. Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001; 34(2):248-253.
40. Casey CA, Lee SM, Ziz-Seible R, McVicker BL. Impaired receptor-mediated endocytosis: its role in alcohol-induced apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1:S46-9.:S46-S49.
41. Ziol M, Tepper M, Lohez M, Arcangeli G, Ganne N, Christidis C, *et al.* Clinical and biological relevance of hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001; 34(2):254-260.
42. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* 2006; 26(8):912-919.
43. Jaeschke H. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002; 27(1):23-27.
44. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354(6):610-621.
45. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7:d1899-914.
46. Fisher NC, Neil DA, Williams A, Adams DH. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1alpha in alcoholic liver disease. *Gut* 1999; 45(3):416-420.

47. Houshmand P, Zlotnik A. Therapeutic applications in the chemokine superfamily. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7(4):457-460.
48. Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6(2):109-118.
49. Hirano F, Komura K, Fukawa E, Makino I. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced RANTES chemokine expression via activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase: roles of TNF-alpha in alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2003; 38(4):483-489.
50. Maltby J, Wright S, Bird G, Sheron N. Chemokine levels in human liver homogenates: associations between GRO alpha and histopathological evidence of alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1996; 24(5):1156-1160.
51. Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R, Cavicchia MR, Giorgini S, Allegretti M. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 2006; 112(1):139-149.
52. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68(1):1-8.
53. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:217-42.:217-242.
54. Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, Bellot P, Miquel R, Moreno M, et al. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology* 2007; 132(2):687-697.
55. Alcoholic liver disease: morphological manifestations. Review by an international group. *Lancet* 1981; 1(8222):707-711.
56. Carithers RL, Jr., Herlong HF, Diehl AM, Shaw EW, Combes B, Fallon HJ, et al. Methylprednisolone therapy in patients with severe alcoholic hepatitis. A randomized multicenter trial. *Ann Intern Med* 1989; 110(9):685-690.
57. Rincon D, Lo IO, Ripoll C, Gomez-Camarero J, Salcedo M, Catalina MV, et al. Prognostic value of hepatic venous pressure gradient for in-hospital mortality of patients with severe acute alcoholic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25(7):841-848.
58. Sumino Y, Kravetz D, Kanel GC, McHutchison JG, Reynolds TB. Ultrasonographic diagnosis of acute alcoholic hepatitis 'pseudoparallel channel sign' of intrahepatic artery dilatation. *Gastroenterology* 1993; 105(5):1477-1482.
59. Colli A, Cocciolo M, Mumoli N, Cattalini N, Fraquelli M, Conte D. Hepatic artery resistance in alcoholic liver disease. *Hepatology* 1998; 28(5):1182-1186.
60. Han SH, Rice S, Cohen SM, Reynolds TB, Fong TL. Duplex Doppler ultrasound of the hepatic artery in patients with acute alcoholic hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34(5):573-577.

61. O'Shea RS, McCullough AJ. Treatment of alcoholic hepatitis. *Clin Liver Dis* 2005; 9(1):103-134.
62. Elphick DA, Dube AK, McFarlane E, Jones J, Gleeson D. Spectrum of Liver Histology in Presumed Decompensated Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol* 2007; .
63. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, Weber FL, Jr., Mezey E, White RI, Jr. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978; 75(2):193-199.
64. Mendenhall CL, Anderson S, Garcia-Pont P, Goldberg S, Kiernan T, Seeff LB, *et al*. Short-term and long-term survival in patients with alcoholic hepatitis treated with oxandrolone and prednisolone. *N Engl J Med* 1984; 311(23):1464-1470.
65. Kulkarni K, Tran T, Medrano M, Yoffe B, Goodgame R. The role of the discriminant factor in the assessment and treatment of alcoholic hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38(5):453-459.
66. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000; 31(4):864-871.
67. Kremers WK, van IM, Kim WR, Freeman RB, Harper AM, Kamath PS, *et al*. MELD score as a predictor of pretransplant and posttransplant survival in OPTN/UNOS status 1 patients. *Hepatology* 2004; 39(3):764-769.
68. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, Edwards EB, Malinchoc M, Kremers WK, *et al*. MELD and PELD: application of survival models to liver allocation. *Liver Transpl* 2001; 7(7):567-580.
69. Dunn W, Jamil LH, Brown LS, Wiesner RH, Kim WR, Menon KV, *et al*. MELD accurately predicts mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2005; 41(2):353-358.
70. Sheth M, Riggs M, Patel T. Utility of the Mayo End-Stage Liver Disease (MELD) score in assessing prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *BMC Gastroenterol* 2002; 2:2.
71. Srikureja W, Kyulo NL, Runyon BA, Hu KQ. MELD score is a better prognostic model than Child-Turcotte-Pugh score or Discriminant Function score in patients with alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2005; 42(5):700-706.
72. Forrest EH, Morris AJ, Stewart S, Phillips M, Oo YH, Fisher NC, *et al*. The Glasgow alcoholic hepatitis score identifies patients who may benefit from corticosteroids. *Gut* 2007; 56(12):1743-1746.
73. Forrest EH, Morris AJ, Stewart S, Phillips M, Oo YH, Fisher NC, *et al*. The Glasgow alcoholic hepatitis score identifies patients who may benefit from corticosteroids. *Gut* 2007; 56(12):1743-1746.

74. Vanbiervliet G, Le Breton F, Rosenthal-Allieri MA, Gelsi E, Marine-Barjoan E, Anty R, *et al.* Serum C-reactive protein: a non-invasive marker of alcoholic hepatitis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41(12):1473-1479.
75. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, Weber FL, Jr., Mezey E, White RI, Jr. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978; 75(2):193-199.
76. Pares A, Caballeria J, Bruguera M, Torres M, Rodes J. Histological course of alcoholic hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage. *J Hepatol* 1986; 2(1):33-42.
77. Stickel F, Hoehn B, Schuppan D, Seitz HK. Review article: Nutritional therapy in alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18(4):357-373.
78. Morgan MY. The treatment of alcoholic hepatitis. *Alcohol Alcohol* 1996; 31(2):117-134.
79. Alvarez MA, Cabre E, Lorenzo-Zuniga V, Montoliu S, Planas R, Gassull MA. Combining steroids with enteral nutrition: a better therapeutic strategy for severe alcoholic hepatitis? Results of a pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16(12):1375-1380.
80. Cabre E, Rodriguez-Iglesias P, Caballeria J, Quer JC, Sanchez-Lombrana JL, Pares A, *et al.* Short- and long-term outcome of severe alcohol-induced hepatitis treated with steroids or enteral nutrition: a multicenter randomized trial. *Hepatology* 2000; 32(1):36-42.
81. Rambaldi A, Saconato HH, Christensen E, Thorlund K, Wetterslev J, Gluud C. Systematic review: glucocorticosteroids for alcoholic hepatitis--a Cochrane Hepato-Biliary Group systematic review with meta-analyses and trial sequential analyses of randomized clinical trials. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27(12):1167-1178.
82. Mathurin P, Louvet A, Dharancy S. Treatment of severe forms of alcoholic hepatitis: where are we going? *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1:S60-2.:S60-S62.
83. Mathurin P, Abdelnour M, Ramond MJ, Carbonell N, Fartoux L, Serfaty L, *et al.* Early change in bilirubin levels is an important prognostic factor in severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. *Hepatology* 2003; 38(6):1363-1369.
84. Louvet A, Naveau S, Abdelnour M, Ramond MJ, Diaz E, Fartoux L, *et al.* The Lille model: A new tool for therapeutic strategy in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids. *Hepatology* 2007.
85. Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119(6):1637-1648.
86. Louvet A, Diaz E, Dharancy S, Coevoet H, Texier F, Thevenot T, *et al.* Early switch to pentoxifylline in patients with severe alcoholic hepatitis is

- inefficient in non-responders to corticosteroids. *J Hepatol* 2008; 48(3):465-470.
87. Bird GL, Sheron N, Goka AK, Alexander GJ, Williams RS. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med* 1990; 112(12):917-920.
 88. Felver ME, Mezey E, McGuire M, Mitchell MC, Herlong HF, Veech GA, *et al.* Plasma tumor necrosis factor alpha predicts decreased long-term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14(2):255-259.
 89. Spahr L, Rubbia-Brandt L, Frossard JL, Giostra E, Rougemont AL, Pugin J, *et al.* Combination of steroids with infliximab or placebo in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled pilot study. *J Hepatol* 2002; 37(4):448-455.
 90. Naveau S, Chollet-Martin S, Dharancy S, Mathurin P, Jouet P, Piquet MA, *et al.* A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2004; 39(5):1390-1397.
 91. Menon KV, Stadheim L, Kamath PS, Wiesner RH, Gores GJ, Peine CJ, *et al.* A pilot study of the safety and tolerability of etanercept in patients with alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(2):255-260.
 92. Boetticher NC, Peine CJ, Kwo P, Abrams GA, Patel T, Aqel B, *et al.* A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Multicenter Trial of Etanercept in the Treatment of Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* 2008.
 93. Madhotra R, Gilmore IT. Recent developments in the treatment of alcoholic hepatitis. *QJM* 2003; 96(6):391-400.
 94. Phillips M, Curtis H, Portmann B, Donaldson N, Bomford A, O'Grady J. Antioxidants versus corticosteroids in the treatment of severe alcoholic hepatitis--a randomised clinical trial. *J Hepatol* 2006; 44(4):784-790.
 95. Samara K, Liu C, Soldevila-Pico C, Nelson DR, Abdelmalek MF. Betaine resolves severe alcohol-induced hepatitis and steatosis following liver transplantation. *Dig Dis Sci* 2006; 51(7):1226-1229.
 96. Stewart S, Prince M, Bassendine M, Hudson M, James O, Jones D, *et al.* A randomized trial of antioxidant therapy alone or with corticosteroids in acute alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2007; 47(2):277-283.
 97. Mezey E, Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Caballeria J, Pares A. A randomized placebo controlled trial of vitamin E for alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2004; 40(1):40-46.
 98. Halle P, Pare P, Kaptein E, Kanel G, Redeker AG, Reynolds TB. Double-blind, controlled trial of propylthiouracil in patients with severe acute alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1982; 82(5 Pt 1):925-931.

99. Orrego H, Kalant H, Israel Y, Blake J, Medline A, Rankin JG, *et al.* Effect of short-term therapy with propylthiouracil in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1979; 76(1):105-115.
100. Rambaldi A, Gluud C. Meta-analysis of propylthiouracil for alcoholic liver disease--a Cochrane Hepato-Biliary Group Review. *Liver* 2001; 21(6):398-404.
101. Akriviadis EA, Steindel H, Pinto PC, Fong TL, Kanel G, Reynolds TB, *et al.* Failure of colchicine to improve short-term survival in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1990; 99(3):811-818.
102. Rambaldi A, Gluud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis. *Liver* 2001; 21(2):129-136.
103. Trinchet JC, Beaugrand M, Callard P, Hartmann DJ, Gotheil C, Nuschens BV, *et al.* Treatment of alcoholic hepatitis with colchicine. Results of a randomized double blind trial. *Gastroenterol Clin Biol* 1989; 13(6-7):551-555.
104. Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI, *et al.* Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* 2008; 42(8):675-682.
105. Ichai P, Samuel D. Extracorporeal liver support with MARS in liver failure: has it a role in the treatment of severe alcoholic hepatitis? *J Hepatol* 2003; 38(1):104-106.
106. Jalan R, Sen S, Steiner C, Kapoor D, Alisa A, Williams R. Extracorporeal liver support with molecular adsorbents recirculating system in patients with severe acute alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2003; 38(1):24-31.
107. Sen S, Mookerjee RP, Cheshire LM, Davies NA, Williams R, Jalan R. Albumin dialysis reduces portal pressure acutely in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2005; 43(1):142-148.
108. Pares A, Deulofeu R, Cisneros L, Escorsell A, Salmeron JM, Caballeria J, *et al.* Albumin dialysis improves hepatic encephalopathy and decreases circulating phenolic aromatic amino acids in patients with alcoholic hepatitis and severe liver failure. *Crit Care* 2009; 13(1):R8.
109. Laleman W, Wilmer A, Evenepoel P, Elst IV, Zeegers M, Zaman Z, *et al.* Effect of the molecular adsorbent recirculating system and Prometheus devices on systemic haemodynamics and vasoactive agents in patients with acute-on-chronic alcoholic liver failure. *Crit Care* 2006; 10(4):R108.
110. Zhang FK, Zhang JY, Jia JD. Treatment of patients with alcoholic liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4(1):12-17.
111. Starzl TE, Van TD, Tzakis AG, Iwatsuki S, Todo S, Marsh JW, *et al.* Orthotopic liver transplantation for alcoholic cirrhosis. *JAMA* 1988; 260(17):2542-2544.
112. Tome S, Martinez-Rey C, Gonzalez-Quintela A, Gude F, Brage A, Otero E, *et al.* Influence of superimposed alcoholic hepatitis on the outcome of liver transplantation for end-stage alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2002; 36(6):793-798.

113. Mathurin P. Is alcoholic hepatitis an indication for transplantation? Current management and outcomes. *Liver Transpl* 2005; 11(11 Suppl 2):S21-S24.
114. Forrest EH, Evans CD, Stewart S, Phillips M, Oo YH, McAvoy NC, *et al.* Analysis of factors predictive of mortality in alcoholic hepatitis and derivation and validation of the Glasgow alcoholic hepatitis score. *Gut* 2005; 54(8):1174-1179.
115. Forrest EH, Morris J, Stewart S, Phillips M, Oo YH, Fisher N, *et al.* The Glasgow Alcoholic Hepatitis Score Identifies Patients Who May Benefit From Corticosteroids. *Gut* 2007.
116. Jeong JY, Sohn JH, Son BK, Paik CH, Kim SH, Han DS, *et al.* [Comparison of Model for End-stage Liver Disease Score with Discriminant Function and Child-Turcotte-Pugh Scores for Predicting Short-term Mortality in Korean Patients with Alcoholic Hepatitis.]. *Korean J Gastroenterol* 2007; 49(2):93-99.
117. Kim YC, Kim SY, Sohn YR. Effect of age increase on metabolism and toxicity of ethanol in female rats. *Life Sci* 2003; 74(4):509-519.
118. Blitzer BL, Mutchnick MG, Joshi PH, Phillips MM, Fessel JM, Conn HO. Adrenocorticosteroid therapy in alcoholic hepatitis. A prospective, double-blind randomized study. *Am J Dig Dis* 1977; 22(6):477-484.
119. Bories P, Guedj JY, Mirouze D, Yousfi A, Michel H. [Treatment of acute alcoholic hepatitis with prednisolone. 45 patients]. *Presse Med* 1987; 16(16):769-772.
120. Campra JL, Hamlin EM, Jr., Kirshbaum RJ, Olivier M, Redeker AG, Reynolds TB. Prednisone therapy of acute alcoholic hepatitis. Report of a controlled trial. *Ann Intern Med* 1973; 79(5):625-631.
121. Depew W, Boyer T, Omata M, Redeker A, Reynolds T. Double-blind controlled trial of prednisolone therapy in patients with severe acute alcoholic hepatitis and spontaneous encephalopathy. *Gastroenterology* 1980; 78(3):524-529.
122. Lesesne HR, Bozymski EM, Fallon HJ. Treatment of alcoholic hepatitis with encephalopathy. Comparison of prednisolone with caloric supplements. *Gastroenterology* 1978; 74(2 Pt 1):169-173.
123. Mathurin P, Duchatelle V, Ramond MJ, Degott C, Bedossa P, Erlinger S, *et al.* Survival and prognostic factors in patients with severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. *Gastroenterology* 1996; 110(6):1847-1853.
124. Porter HP, Simon FR, Pope CE, Volwiler W, Fenster LF. Corticosteroid therapy in severe alcoholic hepatitis. A double-blind drug trial. *N Engl J Med* 1971; 284(24):1350-1355.
125. Schlichting P, Juhl E, Poulsen H, Winkel P. Alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis. Clinical significance and effect of long-term prednisone treatment. *Scand J Gastroenterol* 1976; 11(3):305-312.

126. Shumaker JB, Resnick RH, Galambos JT, Makopour H, Iber FL. A controlled trial of 6-methylprednisolone in acute alcoholic hepatitis. With a note on published results in encephalopathic patients. *Am J Gastroenterol* 1978; 69(4):443-449.
127. Theodossi A, Eddleston AL, Williams R. Controlled trial of methylprednisolone therapy in severe acute alcoholic hepatitis. *Gut* 1982; 23(1):75-79.
128. Said A, Williams J, Holden J, Remington P, Gangnon R, Musat A, *et al.* Model for end stage liver disease score predicts mortality across a broad spectrum of liver disease. *J Hepatol* 2004; 40(6):897-903.
129. Strauss E, Aersa JP. [Alcoholic hepatitis: bad prognosis due to concomitant bacterial infections]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37(3):199-203.
130. Ishii K, Furudera S, Kumashiro R, Seo J, Koga Y, Sata M, *et al.* Role of serum interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 in the severity of alcoholic hepatitis. *Alcohol Alcohol Suppl* 1994; 29(1):81-85.
131. Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 1997; 26(6):1530-1537.
132. Ponnappa BC, Israel Y, Aini M, Zhou F, Russ R, Cao QN, *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisense oligonucleotides. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(4):569-577.
133. Saito H, Ishii H. Recent understanding of immunological aspects in alcoholic hepatitis. *Hepatol Res* 2004; 30(4):193-198.
134. Tipoe GL, Liong EC, Casey CA, Donohue TM, Jr., Eagon PK, So H, *et al.* A voluntary oral ethanol-feeding rat model associated with necroinflammatory liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2008; 32(4):669-682.
135. Nanji AA, Jokelainen K, Fotouhinia M, Rahemtulla A, Thomas P, Tipoe GL, *et al.* Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281(6):G1348-G1356.
136. Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, *et al.* Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999; 30(4):934-943.
137. Swiatkowska-Stodulska R, Bakowska A, Drobinska-Jurowiecka A. Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Med Sci Monit* 2006; 12(5):CR215-CR220.
138. Devalaraja MN, McClain CJ, Barve S, Vaddi K, Hill DB. Increased monocyte MCP-1 production in acute alcoholic hepatitis. *Cytokine* 1999; 11(11):875-881.
139. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999; 19(2):205-219.

140. Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. IFN-gamma/STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(5):G1044-G1052.

