

VNIVERSITAT^Q DE VALÈNCIA

Fundación Investigación Clínico de Valencia-INCLIVA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS



CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL INMUNOFENOTIPO ASOCIADOS A LA APARICIÓN DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Alba Mangas Losada

Dirigida por:

Dra. Carmina Montoliu

Dr. Vicente Felipo

Valencia, 2017



La Dra. **Carmina Montoliu Félix**, investigadora de la FIHCV-INCLIVA y profesora del departamento de Patología de la Universidad de Valencia,

El Dr. **Vicente Felipo Orts**, investigador y jefe del laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D^a Alba Mangas Losada, titulada **“Caracterización de los cambios en el inmunofenotipo asociados a la aparición de la encefalopatía hepática mínima en pacientes cirróticos”**, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, Marzo de 2017.

Carmina Montoliu

Vicente Felipo

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, la Doctora Carmina Montoliu y el Doctor Vicente Felipo, haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo durante estos años y haber podido realizar mi trabajo de tesis doctoral.

Agradecer también, la colaboración de los médicos del servicio de Hepatología de los Hospitales Clínico de Valencia y Arnau de Vilanova y por supuesto, la colaboración de los pacientes y controles que han participado en el estudio, sin los cuales no hubiese sido posible este trabajo.

Gracias también al Doctor Vicent Teruel por darme la oportunidad de iniciarme en la docencia de la Facultad.

Y gracias al Doctor Michiel Pegtel y a su laboratorio en la VUmc en Ámsterdam por acogerme durante mi estancia de tesis.

A nivel más personal, quiero agradecer la ayuda y amistad de todos mis compañeros de viaje, tanto los del I-06 del Cipf (Mar, Paqui, Maricarmen, Marta, Andrea, Michele, Ana, Tiziano, Belén y Lucas) como a los del Incliva (Amparo, de mi laboratorio, gracias por toda la ayuda prestada y al resto del pasillo: Bego, Sandra, Edu, Birlipta, Iris, Carla, Alberto, encantada de haberos tenido de compañeros en algún momento, Andreu, Carlos, Rai, Jaume...gracias chicos por todos los momentos compartidos, os merecéis lo mejor y seguro lo tendréis, Anna, Paola, Paula, sois las mejores, por muchos más “viernes interesantes”, Estefanía, Jenny, aunque no sigáis por el Incliva, ha sido un gran placer haberos conocido) y en especial a todos aquellos a los que considero mis amig@s más allá de las puertas del trabajo, y gracias por todos los momentos de risas, festivales, cervezas, viajes y fiestas sin los que no hubiese podido sobrellevar esta dura etapa ;)

Por supuesto, no me olvido de mi COMPAÑERA de tesis, de sushi, de resos, de risas, de llantos, de quejas, de arte...Raquel, sabes que sin ti, estos años, hubiesen sido grises y sin colores bonitos ;)

Por último, quiero agradecerse al resto de mis amigos, a las del toda la vida, a los de la carrera de Biología donde comenzó todo en Salamanca, a los del máster, donde me decidí por la Neuro y a mi familia, por el apoyo incondicional en todas las decisiones de mi vida.

“El trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de su utilidad directa. Debe hacerse por sí mismo, por la belleza de la ciencia, y entonces siempre existe la posibilidad de que un descubrimiento científico se convierta en un beneficio para la humanidad”

Marie Curie

A mi familia

Abreviaturas

AHR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
ALT	Alanina Aminotransferasa
AST	Aspartato Aminotransferasa
BCR	Receptor de Células B
BHE	Barrera Hemato Encefálica
BSA	Albumina de Suero Bovino
CDF	Células Dendríticas Foliculares
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
EEG	Electroencefalograma
EEM	Error Estándar de la Media
EH	Encefalopatía Hepática
EHM	Encefalopatía Hepática Mínima
FA	Fosfatasa Alcalina
FBS	Suero Bovino Fetal
GGT	Gamma-glutamil Trasnpeptidasa
GMPc	Guanosín Monofosfato cíclico
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferón Gamma
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
iTreg	T reguladora inducible
LPS	Lipopolisacárido
LT α 1 β 2	Linfotoxina alpha 1 beta 2
MELD	<i>Model for End-stage Liver Disease</i>
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	Proteína C Reactiva

PET Tomografía por Emisión de Positrones

PHES *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*

RPM Revoluciones Por Minuto

SNAP *S-nitroso-N-acetyl-penicillamine*

SNC Sistema Nervioso Central

STAT3 *Signal Transducers and Activators of Transcription 3*

TA Temperatura Ambiente

TCR Receptor de Células T

Tfh Linfocito T *helper* folicular

TGFβ *Transforming Growth Factor Beta*

Th T Linfocito T *helper*

TLR Receptores de tipo Toll

TNFα Factor de Necrosis Tumoral

TSPO *Translocator Protein*

Índice

Índice

I. Introducción	1
1. Cirrosis hepática	3
1.1. Alteraciones asociadas a la cirrosis.....	4
1.1.1. Hiperamonemia.....	5
1.1.2. Inflamación.....	5
1.1.3. Translocación bacteriana.....	6
1.2. Marcadores clínicos de función hepática.....	6
2. Encefalopatía hepática (EH)	9
2.1. Encefalopatía hepática mínima (EHM).....	10
2.2. Alteraciones neurológicas en la EH y la EHM.....	10
2.2.1. Alteraciones neuropsiquiátricas.....	10
2.2.2. Alteraciones cognitivas.....	11
2.2.3. Alteraciones motoras.....	13
2.2.4. Otras alteraciones neuropsiquiátricas.....	16
2.3. Factores que contribuyen a la EH clínica y mínima.....	16
2.3.1. Hiperamonemia.....	16
2.3.2. Inflamación.....	18
2.3.2.1. Inflamación en pacientes con EH. Sinergia entre hiperamonemia e inflamación.....	18
2.3.3. Neuroinflamación.....	19
2.3.3.1. Neuroinflamación en pacientes con EH.....	19
3. El sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria	21
3.1. Visión general del sistema inmunitario.....	21
3.2. Papel de los diferentes tipos de leucocitos en sangre.....	21
3.2.1. Respuesta humoral: papel de los linfocitos B.....	23
3.2.2. Respuesta celular: papel de los linfocitos T.....	24
3.2.2.1. Diferenciación de los linfocitos T <i>helper</i> CD4.....	26
3.2.3. Papel de los monocitos y macrófagos.....	29
3.3. Mecanismos implicados en la inflamación periférica.....	30
3.3.1. Marcadores de inflamación: CD69.....	30
3.3.2. Mediadores de la inflamación: las citocinas.....	32
3.3.3. Citoquinas de interés y sus vías de actuación.....	36
3.3.3.1. Papel del STAT3 en linfocitos: vías de señalización de la	

IL-6, IL-17, IL-21 e IL-22.....	36
3.3.3.2. Papel de diferentes citocinas sobre los linfocitos B y los centros germinales.....	37
3.4. Relación entre el sistema periférico y el sistema nervioso central (SNC).....	39
4. Alteraciones en el sistema inmunitario de pacientes cirróticos.....	41
4.1. Hígado cirrótico y alteraciones inmunológicas.....	41
4.2. La enfermedad hepática y la autoinmunidad.....	43
II. Objetivos.....	45
III. Material Y Métodos.....	49
1. Pacientes y controles.....	51
1.1. Extracción de sangre.....	52
1.2. Realización de los test psicométricos.....	52
2. Clasificación de pacientes con Encefalopatía Hepática Mínima.....	53
2.1. PHES.....	53
3. Estudio de las alteraciones cognitivas.....	55
3.1. Test de Stroop de colores y palabras.....	55
3.2. Test d2.....	57
3.3. Test de claves oral.....	58
3.4. Test de dígitos oral.....	59
3.5. Test de letras y números oral.....	59
4. Estudio de alteraciones en la coordinación motora.....	60
4.1. Test de coordinación bimanual.....	60
4.2. Test de coordinación visomotora.....	60
5. Determinación de amonio en sangre.....	61
6. Aislamiento de células mononucleares (PBMC).....	62
7. Medida relativa de proteínas a partir de las PBMC aisladas de la sangre mediante la técnica de <i>Western Blot</i>.....	64
8. Medida de la expresión génica a partir de PBMC aisladas de la sangre.....	66
8.1. Aislamiento de RNA total.....	66
8.2. Retrotranscripción del RNA.....	67
8.3. PCR cuantitativa (qPCR).....	67
9. Estudio de activación de linfocitos in vitro a partir de las PBMC.....	68

10. Determinación de parámetros bioquímicos en suero, plasma y medio de cultivo	70
10.1. Medida de Interleucinas (ILs) en suero o medio de cultivo.....	70
10.2. Determinación de LPS en suero.....	71
10.3. Medida de proteínas en plasma.....	72
10.3.1. Medida de inmunoglobulina G (IgG) en plasma.....	72
10.3.2. Medida de la metalopeptidasa MMP9 en plasma.....	72
11. Estudio de transcriptómica a partir de sangre total	73
12. Estudio de poblaciones leucocitarias a partir de sangre total mediante citometría de flujo	75
12.1. Estudio cuantitativo de cada una de las poblaciones leucocitarias.....	76
12.2. Estudio de marcadores de activación de las diferentes poblaciones celulares.....	77
12.3. Estudio de la población de monocitos.....	77
12.4. Estudio de la población de linfocitos T.....	78
12.4.1. Poblaciones <i>naïve</i> y de memoria.....	78
12.4.2. Linfocitos T auto-reactivos.....	79
12.4.3. Linfocitos T reguladores (Treg).....	80
13. Análisis estadístico	82
IV. Resultados	85
1. Estudio de la cohorte de pacientes y controles	87
1.1. Composición de los diferentes grupos y etiología de la enfermedad hepática.....	87
1.2. Características clínicas.....	87
1.3. Estudio de alteraciones cognitivas y motoras.....	89
1.3.1. Alteraciones cognitivas en pacientes con EHM.....	90
1.3.1.1. Atención selectiva.....	90
1.3.1.2. Atención selectiva-sostenida y concentración mental.....	91
1.3.1.3. Memoria de trabajo.....	91
1.3.2. Alteraciones motoras en pacientes con EHM.....	91
2. Estudio de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica	92
2.1. Análisis cuantitativo de las poblaciones leucocitarias en sangre.....	92
2.2. Distribución en porcentajes de las poblaciones leucocitarias en sangre.....	94
2.3. Estudio de los monocitos en sangre periférica.....	96
2.4. Estudio de los linfocitos en sangre periférica.....	98
2.4.1. Linfocitos T.....	98
2.4.1.1. Linfocitos <i>helper</i> CD4.....	99
2.4.1.2. Linfocitos citotóxicos CD8.....	104

2.4.2. Linfocitos B.....	108
2.3. Estudio de la diferenciación de los distintos subtipos de linfocitos CD4.....	109
2.3.1. Estudio de los factores de transcripción.....	109
2.3.2. Estudio de la secreción de citocinas <i>in vitro</i>	110
2.3.3. Estudio de las T reguladoras.....	111
3. Estudio de los niveles de citocinas en suero.....	113
4. Estudio del factor de transcripción STAT3 en PBMC.....	118
5. Estudio de la metaloproteínasa MMP9 en plasma.....	120
6. Estudio del antígeno leucocitario humano (HLA) en sangre total.....	122
7. Estudio de la capacidad predictiva de parámetros estudiados en el diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima.....	124
7.1. Correlación entre los diferentes parámetros estudiados y las alteraciones cognitivas y motoras de los pacientes con encefalopatía hepática mínima.....	124
7.1.1. Alteraciones cognitivas.....	124
7.1.2. Alteraciones motoras.....	130
7.2. Correlación entre los diferentes parámetros estudiados y la detección de la encefalopatía hepática mínima clasificada por el PHES y estudio de la capacidad predictiva de los mismos.....	131
V. Discusión.....	135
1. Alteraciones cognitivas y motoras en pacientes cirróticos con EHM.....	137
1.1. Alteraciones cognitivas en pacientes con EHM.....	138
1.1.1. Atención selectiva.....	138
1.1.2. Atención selectiva-sostenida y concentración mental.....	138
1.1.3. Memoria de trabajo.....	139
1.2. Alteraciones en la coordinación motora.....	139
2. Hiperamonemia e inflamación en pacientes cirróticos con EHM.....	140
3. Alteraciones en el inmunofenotipo de pacientes cirróticos con EHM.....	142
3.1. Daño hepático.....	142
3.2. Poblaciones celulares en sangre.....	143
3.3. Alteraciones específicas en las poblaciones leucocitarias en pacientes cirróticos asociadas a la aparición de la EHM.....	143
VI. Conclusiones.....	155
VII. Bibliografía.....	159

I. Introducción

1. Cirrosis hepática

La cirrosis hepática es el estadio final de un proceso de fibrosis progresiva secundaria a un daño hepático crónico, caracterizándose por la distorsión de la arquitectura del hígado y formación de nódulos de regeneración. Esto puede desencadenar una hipertensión portal e insuficiencia hepatocelular.

Las principales causas de la cirrosis hepática son el consumo de alcohol, virus de hepatitis C y el hígado graso asociado a la obesidad (Friedman y Schiano, 2004).

En la práctica clínica, el diagnóstico de la cirrosis se establece en base a una biopsia hepática con presencia de nódulos de regeneración, o por combinación de datos clínicos (indicios de cirrosis), analíticos (hiperbilirrubinemia, coagulopatía...) y radiológicos (morfología nodular o heterogénea) característicos de esta patología.

Epidemiología de la cirrosis

Según los datos más recientes, en Estados Unidos llegaron a unas 38.000 muertes por enfermedad hepática crónica y cirrosis en el 2014, lo que supuso un 1,5% del total de muertes anuales (Kochanek et al., 2016). En España, de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.es/>) el número de defunciones por esta causa ha disminuido considerablemente, pasando de unos 6.000 casos anuales en el año 2000 a unos 4.800 casos en el año 2014.

Sin embargo, existen varios factores que hacen pensar que la prevalencia de esta patología es mayor (Schuppan y Afdhal, 2008), ya que hay causas de enfermedad hepática que pueden no ser diagnosticadas, como las infecciones crónicas por virus B y C, o la esteatohepatitis. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la cirrosis en su fase compensada, es indetectable durante largos periodos de tiempo.

Estadios de la cirrosis

La cirrosis se caracteriza por una fase sin síntomas evidentes, denominada "cirrosis compensada", seguida de una progresión a una fase de "cirrosis descompensada" caracterizada por complicaciones derivadas de la hipertensión portal y de la insuficiencia hepática. En la fase de cirrosis compensada, la presión portal no suele provocar varices gastro-esofágicas ni ascitis. Sin embargo, conforme el daño hepático avanza, esta presión aumenta y la función hepática

disminuye, dando lugar a ascitis, hemorragia digestiva, ictericia y encefalopatía hepática. Estos son los síntomas que marcan el paso de una fase a la siguiente.

En clínica, el estadio de la cirrosis se establece en base a las siguientes escalas de función hepática (Tabla 1):

- Child-Pugh (Child y Turcotte, 1964): es la más utilizada y permite clasificar la gravedad, riesgo quirúrgico y el pronóstico global.
- MELD (Kamath et al., 2001): es un índice pronóstico de la cirrosis en su fase avanzada que se aplica principalmente para la priorización de trasplantes hepáticos de pacientes.

Tabla 1. Escalas Child-Pugh y MELD.

Clasificación Child-Pugh			
Parámetros/Puntos	1 punto	2 puntos	3 puntos
Bilirrubina	< 2 mg/dl	2-3 mg/dl	> 3 mg/dl
Albúmina	> 3,5 mg/dl	2,8-3,5 mg/dl	< 3,5 mg/dl
Protrombina (Tiempo)	> 50%	30-50%	< 30%
Protrombina (INR)	<1,7	1,7-2,3	> 2,3
Ascitis	No	Leve	Moderada-grave o con diuréticos
Encefalopatía Hepática	No	Grados I-II	Grados III-IV

Índice MELD

$$\text{MELD} = 9,6 \times [\text{Ln creatinina (mg/dl)}] + 3,8 [\text{Ln bilirrubina (mg/dl)}] + 11,2 [\text{Ln INR}] + 6,4$$

INR, International Normalized Ratio

El Child-Pugh se puntúa con un número y una letra dependiendo de la gravedad de la cirrosis: Child A ≤6 puntos, Child B= 7-9 puntos, Child C ≥ 10 puntos. INR, International Normalized Ratio; MELD, Model for End-stage Liver Disease; Ln, logaritmo neperiano.

1.1. Alteraciones asociadas a la cirrosis

La alteración de la función hepática en cirrosis conduce a una amplia variedad de alteraciones en la detoxificación de distintas sustancias y metabolitos y en la síntesis y secreción de algunas moléculas como la albúmina. Dada su relevancia en la inducción de la encefalopatía

hepática y en el contexto de esta tesis, se describen a continuación algunas de las alteraciones más relevantes: la hiperamonemia, la inflamación y la translocación bacteriana.

1.1.1. Hiperamonemia

El amonio es un producto del metabolismo de proteínas y otros compuestos nitrogenados. A concentraciones altas, es tóxico y altera la función del sistema nervioso central (SNC).

Normalmente, el amonio es detoxificado en el hígado mediante el ciclo de la urea y es eliminado con la orina. En tejidos como el cerebro y el músculo, el amonio se detoxifica por incorporación de glutamina, que se transporta al hígado, donde la glutaminasa la escinde en glutamato y amonio para, finalmente, eliminarse por el ciclo de la urea.

En enfermedades hepáticas, como la cirrosis, el amonio no es eliminado eficientemente, aumentando así sus niveles tanto en sangre como en cerebro, actuando como agente neurotóxico. Datos experimentales y clínicos apoyan que la hiperamonemia juega un papel esencial en el desarrollo de la encefalopatía hepática (HE). (Ver apartado 2.3.1)

1.1.2. Inflamación

La inflamación es la respuesta inmune del organismo frente a agresiones externas o a agentes patógenos. Este proceso se caracteriza por un aumento del flujo sanguíneo en la zona afectada y diversos tipos de respuestas celulares con el objetivo de aislar y destruir el agente nocivo.

El proceso inflamatorio se puede desencadenar por agentes biológicos (bacterias, virus, hongos, parásitos), por agentes químicos (toxinas, venenos, ácidos), agentes físicos (radiaciones, calor, frío), traumatismos, alteraciones vasculares (isquemia) o alteraciones inmunitarias (hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes).

En la inflamación participan distintos tipos celulares y mediadores de la inflamación que son pequeñas biomoléculas que median la comunicación intercelular. Estos mediadores pueden ser de origen lipídico (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos), proteico (citocina, factores de crecimiento, interleucinas) y aminas vasoactivas (serotonina, histamina). Amplifican la respuesta inflamatoria uniéndose a receptores específicos presentes en las células diana.

En el apartado 3.3.2. hablaremos en más profundidad sobre las citocina y mediadores de la inflamación.

1.1.3. Translocación bacteriana

Una complicación común en cirrosis es la peritonitis bacteriana espontánea y es una causa importante de mortalidad intrahospitalaria. Las bacterias de origen entérico atraviesan las paredes intestinales mediante un mecanismo llamado translocación bacteriana y llegan a alcanzar nódulos linfáticos mesentéricos y desde aquí, la circulación sistémica. Deficiencias en la función hepática, permitirían a las bacterias permanecer en el sistema periférico y de ahí infectar otros fluidos biológicos, como el líquido ascítico, llegando también a otros órganos tales como el hígado, el bazo o el riñón (Such et al., 2002).

Los mecanismos responsables de promover la translocación bacteriana son la alteración en el equilibrio de flora intestinal, el incremento de la permeabilidad de la mucosa de la barrera intestinal y las deficiencias en el sistema inmunitario del paciente (Berg, 1999). En la patología de la cirrosis se observan estos tres mecanismos, por lo que la translocación bacteriana es un factor importante a tener en cuenta. Además, el etanol debilita las paredes intestinales volviéndolas más permeables y favoreciendo el paso de las bacterias al exterior del intestino (Kolios et al., 2006).

Una medida indirecta para detectar los niveles de bacterias intestinales que se han translocado a sangre u otros fluidos, es la detección de lipopolisacáridos (LPS), que son endotoxinas propias de la cubierta de la mayor parte de las bacterias Gram-negativas. Existen kits comerciales para su cuantificación (ver apartado material y métodos).

Además el LPS actúa como un potente estimulador de la inmunidad innata (Alexander y Rietschel, 2001) y es usado en diversos estudios para la activación de células del sistema inmune (Xu et al., 2015).

1.2. Marcadores clínicos de función hepática

Actualmente, en la clínica diaria, se llevan a cabo una serie de mediciones de metabolitos relacionados con el metabolismo hepático que nos indican si hay indicios de daño en el hígado (ver Tabla 2). Los principales se explican a continuación.

-Proteína C reactiva (PCR): es una proteína de origen hepático que se incrementa tras la secreción de interleucina 6 (IL-6) por macrófagos y linfocitos T (Pepys y Hirschfield, 2003). Su papel fisiológico consiste en unirse a la superficie de células dañadas o muertas para activar el sistema del complemento y eliminarlas. Por lo tanto, se ve un aumento de esta proteína cuando hay inflamación en el organismo.

-Bilirrubina total: La bilirrubina es un producto derivado del metabolismo de la hemoglobina. Los hematíes al degradarse liberan la hemoglobina que es metabolizada a dos moléculas, el grupo heme y el grupo globina. El grupo heme se transforma en biliverdina y esta, en bilirrubina, a la cual se le llama "no conjugada" o indirecta. Al pasar por el hígado esta bilirrubina se conjuga con ácido glucurónico transformándose en **bilirrubina "conjugada" o directa**. Cuando se realiza un análisis de rutina se mide la bilirrubina total (directa más indirecta), donde el 70 al 85 % corresponde a la bilirrubina no conjugada o indirecta.

-Alanina aminotransferasa (ALT): es una enzima que se halla principalmente en las células del hígado y del riñón. También se encuentra en pequeñas cantidades en el corazón y los músculos. En condiciones normales, la concentración de la ALT en sangre es baja, pero cuando existe lesión hepática, la ALT se libera al torrente circulatorio, incluso antes de que aparezcan signos evidentes de la lesión, como la ictericia. La ALT es muy útil para la detección de la enfermedad hepática.

-Aspartato aminotransferasa (AST): es una enzima distribuida por las células de todo el organismo aunque principalmente se halla en las células del hígado y el corazón. También se encuentra en pequeñas cantidades en riñón y músculos. En condiciones normales, los niveles de AST en sangre son bajos, pero cuando existe lesión hepática o muscular, la AST se libera al torrente sanguíneo. Por este motivo, la AST también es un buen marcador de lesión hepática.

-Fosfatasa alcalina (FA): es una enzima presente en varios tejidos del organismo como el hígado, hueso, riñón, intestino y placenta. No obstante, sus concentraciones más elevadas se observan en células óseas y hepáticas. En el hígado, la FA se encuentra en el borde de las células que se unen para formar los conductos biliares, que drenan la bilis del hígado a los intestinos. Concentraciones elevadas de FA en sangre suelen asociarse a trastornos hepáticos u óseos. Los niveles de la enzima pueden aumentar considerablemente cuando existe una obstrucción en los conductos biliares. Aumentos no tan marcados se observan en hepatocarcinoma, cirrosis o hepatitis.

-Gamma-glutamil transepsitidasa (GGT): es una enzima que se encuentra en muchos tejidos del organismo, pero principalmente en hígado. Participa en la degradación del glutatión

y en el metabolismo de detoxificación hepática. Niveles elevados de esta enzima serían indicativos de una disfunción en la función hepática, como en caso de consumo elevado de alcohol o patologías como colestasis, hepatitis o cirrosis.

Tabla 2. Rangos fisiológicos de los marcadores periféricos.

MARCADOR SANGRE	RANGO FISIOLÓGICO (DATOS HOSPITAL)
PCR	0-5 mg/L
BILIRRUBINA TOTAL	0,10-1,00 mg/dL
ALT	1-41 U/L
AST	1-37 U/L
FOSFATASA ALCALINA	30-120 U/L
GGT	1-55 U/L

2. Encefalopatía hepática (EH)

La Encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo caracterizado por una alteración funcional del sistema nervioso central subsiguiente a un fallo hepático. El rango de manifestaciones clínicas varía desde alteraciones sutiles en las funciones mentales (ver apartado 2.2), hasta coma profundo y muerte (Gazzard et al., 1986). La EH se presenta en hasta un 50-70% de los pacientes con cirrosis (Riordan y Williams, 1997). Es una alteración potencialmente reversible, pero su aparición conlleva un mal pronóstico.

Dependiendo de la duración y el grado de disfunción hepática existen dos tipos principales de EH clínica: aguda y crónica.

-Encefalopatía hepática aguda: está asociada a un fallo hepático agudo o fulminante y es un síndrome clínico de evolución rápida como consecuencia de una inflamación o necrosis masiva hepática. Las principales causas de este tipo de EH son las hepatitis víricas agudas, intoxicación por paracetamol y reacciones idiosincrásicas a fármacos. El grado de mortalidad es muy elevado, debido en muchos casos al aumento de la presión intracraneal.

-Encefalopatía hepática crónica: es la forma más frecuente de EH clínica. Acompañada por desviación de la sangre portal a la circulación sistémica (EH porto-sistémica). Esto ocurre tras una intervención quirúrgica (anastomosis porta-cava) en un paciente con una enfermedad hepática crónica o espontáneamente en pacientes cirróticos debido a la hipertensión portal. Esta desviación de la sangre impide la correcta eliminación en el hígado de distintas sustancias tóxicas, como el amonio, que pueden de este modo, alcanzar el cerebro y alterar su función. En estos pacientes se pueden producir episodios de EH clínica como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección). Estos episodios de EH son habitualmente reversibles cuando el desencadenante es eliminado.

La EH es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos. Se estima que uno y tres años después del primer episodio de encefalopatía hepática clínica la mortalidad es del 40 y del 70%, respectivamente (Bustamante et al., 1999).

2.1. Encefalopatía hepática mínima (EHM)

Además de los tipos de EH clínica mencionados, existe una forma más leve denominada encefalopatía hepática mínima (EHM), en la cual se centra esta tesis.

Pacientes sin signos evidentes de EH clínica pueden presentar diversos déficits cognitivos (percepción visuo-espacial, atención, concentración) y motores que no son detectables en un examen neurológico rutinario, pero que se ponen de manifiesto cuando se realizan test psicométricos o neurofisiológicos adecuados. Este tipo de EH se denominaba encefalopatía hepática subclínica o latente, términos que hoy en día han sido reemplazados por encefalopatía hepática mínima o EHM (Lockwood et al., 1993, Schomerus y Hamster, 1998, Lockwood, 2000, Ferenci et al., 2002, Amodio et al., 2004, Romero-Gomez et al., 2007).

La EHM disminuye la calidad de vida de los pacientes (Slowik et al. 2001), aumenta el riesgo de padecer accidentes laborales, domésticos y de tráfico y predispone a sufrir EH clínica. Se han utilizado diversas baterías de pruebas psicométricas para detectar y valorar la EHM. Se ha llegado a un consenso para utilizar los mismos test en todos los hospitales, seleccionando como batería de referencia, la denominada PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) (Weissenborn et al., 2001, Ferenci et al., 2002).

Yen y Liaw en 1990 mostraron que el 50% de los pacientes con EH mínima desarrollan EH evidente durante los siguientes 6 meses.

2.2. Alteraciones neurológicas de la EH y EHM

2.2.1. Alteraciones neuropsiquiátricas

En la encefalopatía hepática aguda, los desórdenes neurológicos avanzan desde un estado mental alterado hasta el coma. La muerte ocurre, frecuentemente, por un edema masivo del cerebro y aumento de la presión intracraneal.

Sin embargo, la encefalopatía hepática crónica se desarrolla lentamente y los síntomas varían desde ligeros déficits de atención y cambios en la personalidad en la encefalopatía hepática mínima, a enlentecimiento psicomotor, falta de atención y síntomas extrapiramidales como hipomimia (falta de expresión facial) y bradiquinesia en grado I de EH, desorientación y comportamiento extraño en grado II, acabando finalmente en estupor y coma en grados III y IV

(Weissenborn et al., 2005a). Los signos más tempranos suelen ser alteraciones en el sueño y cambios en el comportamiento (Weissenborn et al., 2005b).

El espectro clínico de la EH es muy amplio, por lo que su diagnóstico puede ser difícil dado que no existe un síntoma o examen de laboratorio específico para su diagnóstico. La gravedad de la EH clínica se clasifica en 4 grados según las manifestaciones neuropsicológicas. En la Tabla 3 se presentan los criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en pacientes con EH clínica.

La EH ocasional está caracterizada por un episodio de alteración neuropsiquiátrica debido a un factor desencadenante y generalmente no deja huellas en los pacientes en términos de alteraciones en los test psicométricos y del electroencefalograma (EEG). La EH recurrente se caracteriza por episodios múltiples de encefalopatía intercalados por periodos en los que la situación neurológica del paciente es aparentemente normal.

Tabla 3. Criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en la Encefalopatía Hepática clínica (Modificado de Conn y Lieberthal, 1979).

GRADOS EH	SINTOMATOLOGÍA
0	Sin anormalidad detectada
1	Leve falta de atención e incapacidad para mantenerla, euforia, ansiedad. Dificultad para realizar suma o sustracción de números sencillos.
2	Letargo, apatía, desorientación en tiempo y espacio. Cambios obvios de la personalidad
3	Somnolencia a semiestupor, pero con respuesta a estímulos. Confusión. Desorientación importante.
4	Coma. Sin posibilidad de realizar pruebas de función mental.

2.2.2. Alteraciones cognitivas

Las alteraciones cognitivas comienzan con falta de concentración y de atención, así como de una disminución de la capacidad intelectual. Los pacientes con EH presentan un descenso continuo en la atención acompañado de un descenso en el estado de alerta desde el grado II al grado III finalizando en coma. Incluso los pacientes que parecen no estar clínicamente afectados

manifiestan distintos déficits de atención en test psicométricos, indicando una disfunción de los tres subsistemas que cooperan en la atención: vigilia (capacidad para mantener el estado de alerta), orientación y funciones ejecutivas (como hacer planes, detección de errores, resolución de conflictos, etc.). En fases más avanzadas, la falta de atención se agudiza de forma que cuando se formula una pregunta a un paciente, frecuentemente necesita una segunda repetición y las repuestas son lentas y a menudo carentes de sentido (Weissenborn et al., 2005a).

Existe cierta controversia en cuanto a si existe o no deterioro en la memoria en los pacientes con EH (Weissenborn et al., 2003). Los test psicométricos empleados para medir la memoria en pacientes con EH evalúan fundamentalmente la memoria semántica y la memoria de trabajo (Weissenborn et al., 2005a). En los test que dependen de la atención, como ocurre en muchos test de memoria, es difícil saber a qué alteración atribuir un error, a la atención o a la memoria. Existen test que permiten diferenciar entre atención y memoria. Uno de ellos es la retención de dígitos (Tewes, 1991), que mide la memoria a corto plazo, cuantificando el número de dígitos ordenados de forma seriada que un paciente puede recordar de forma correcta tras haberlos escuchado o leído. Otro test de memoria a corto-plazo es la lista de palabras de Luria (Christensen, 1984). En estos dos test los pacientes con EH obtienen peores resultados que los sujetos control (Weissenborn et al., 2005a). El test de memoria de fotografías o dibujos mide la memoria a largo plazo. Se muestran al paciente varias imágenes duplicadas y desordenadas y tiene que recordar donde estaban las imágenes duplicadas y emparejarlas. En este test también se han observado alteraciones en los pacientes con EH (Weissenborn et al., 2005b).

Los pacientes con EH presentan otras alteraciones cognitivas como alteraciones en la percepción visuo-espacial que se manifiestan, por ejemplo, en la apraxia (trastorno neurológico caracterizado por la pérdida de la capacidad de llevar a cabo movimientos voluntarios, a pesar de tener capacidad física para hacerlos). También presentan un déficit en el proceso de aprendizaje, mostrando dificultad a la hora de aprender nuevas tareas. Los pacientes cirróticos con EH obtienen peores resultados que individuos controles en pruebas de inteligencia, aprendizaje y memoria así como de percepción motora y espacial (Puca et al., 1989), sin embargo, la capacidad verbal no está alterada. La etiología de la cirrosis no influye en los resultados obtenidos en estas pruebas (Rehnstrom et al., 1977).

Hilsabeck et al. (2002) mostraron que los pacientes con hepatitis crónica causada por el virus C también muestran alteraciones cognitivas en tareas que requieren atención, aprendizaje, velocidad psicomotora y flexibilidad mental, indicando que estos pacientes presentan

alteraciones psicomotoras similares a los de los pacientes con otras enfermedades crónicas hepáticas como la cirrosis por ingesta de alcohol.

Como se ha mencionado antes, en los pacientes con EHM las alteraciones cognitivas no son evidentes y sólo se pueden detectar realizando test psicométricos específicos. El término EHM se refiere a cambios sutiles en la función cognitiva o parámetros electrofisiológicos que pueden ser observados en pacientes con cirrosis que no presentan evidencias clínicas de EH (Amodio et al., 2004). Para diagnosticar la presencia de EH mínima, se utiliza actualmente una batería (PHES) que consta de 5 test psicométricos: Test de conexión numérica A y B, test de la clave de números, test de puntos seriados y test del trazado de línea (explicado en material y métodos).

Los resultados obtenidos en los test de la batería PHES se ajustan en función de la edad y el nivel de formación de acuerdo con las tablas de normalidad de los sujetos control (www.redeh.org).

Se considera que un paciente presenta EHM cuando en esta batería obtiene una puntuación igual o inferior a -4.

Las alteraciones en la capacidad de atención, procesamiento de la información (Dhiman y Chawla, 2009), coordinación motora, etc., tienen importantes consecuencias en la vida diaria de los pacientes. Por ejemplo, la mayoría de los pacientes cirróticos con EHM tienen disminuida la capacidad de conducir vehículos (Schomerus et al., 1981, Bajaj et al., 2009). Los pacientes con EHM presentan alteraciones en funciones de la vida diaria como la interacción social, comportamiento emocional, dormir, trabajar o realizar tareas domésticas (Groeneweg et al., 1998, Prasad et al., 2007).

2.2.3. Alteraciones motoras

En pacientes con encefalopatía hepática crónica se presentan frecuentemente alteraciones en la actividad y coordinación motora (Tabla 4).

Los trastornos del movimiento pueden ser debidos a alteraciones en uno o más de los tres grandes sistemas motores que configuran la organización del sistema motor en mamíferos: vía cortico-espinal, circuitos de los ganglios basales y cerebelo (Alarcon y Giménez-Roldán, 2005). En los pacientes con EH crónica se han descrito alteraciones y síntomas relacionados con los tres niveles de organización.

Manifestaciones clínicas motoras relacionadas con un mal funcionamiento de los ganglios basales (signos extrapiramidales: expresión facial, desórdenes en el habla, alteración al andar, estabilidad postural, bradiquinesia, etc.) se han descrito en pacientes con EHM y cirrosis hepática compensada (Krieger et al., 1996, Jover et al., 2003). Alteraciones de la coordinación motora (cerebelares) están presentes en pacientes con EH de grado I y II, y alteraciones de la vía cortico-espinal en pacientes desde grado I al IV de EH (Krieger et al., 1996, Jones y Weissenborn, 1997).

Jover et al. (2005) realizaron una serie de test psicométricos para medir el deterioro cognitivo, los signos extrapiramidales y la calidad de vida. 22 de los 46 pacientes cirróticos estudiados manifestaron alteraciones motoras extrapiramidales y obtuvieron peores resultados en los test psicométricos y de calidad de vida.

Compañy et al. (2010) comprobaron que la presencia de alteraciones motoras extrapiramidales predice el desarrollo de EH clínica y que los signos avanzan a medida que avanza la enfermedad reduciendo la calidad de vida.

Tabla 4. Alteraciones motoras en pacientes con encefalopatía hepática (clasificación West-Haven) (Modificado de Amodio et al., 2004).

GRADOS EH	SINTOMATOLOGÍA
0	Cambios sutiles en pruebas de conexión numérica o pruebas psicométricas
1	Temblor, incoordinación, apraxia ¹
2	Asterixis ² , lenguaje lento o incomprensible, ataxia ³
3	Reflejos hipoactivos, nistagmo ⁴ , rigidez postural y clonus ⁵
4	Postura descerebrada y dilatación pupilar, reflejo oculocefálico ⁶ , ausencia de respuesta a estímulos en estadios avanzados.

1) Trastorno de la ejecución del movimiento aprendido que no puede ser explicado como consecuencia de debilidad muscular, pérdida sensorial o falta de comprensión o atención a las órdenes verbales

2) Temblor de las manos en forma de aleteo

3) Ausencia o irregularidad en la coordinación de los movimientos musculares

4) Espasmo clónico de los músculos motores del globo ocular, que produce movimientos involuntarios de éste en varios sentidos.

5) *Serie de contracciones rítmicas e involuntarias, de un músculo o grupo muscular por la extensión brusca y pasiva de sus tendones.*

6) *Se desencadena con los ojos abiertos y mediante giro de la cabeza con rapidez de un lado hacia el otro. El paciente comatoso cuyo tallo encefálico este intacto dirige los ojos en la dirección opuesta a aquella en que se gira la cabeza.*

Descripción de algunas alteraciones motoras en pacientes con encefalopatía hepática:

● **Aquinesia:** pobreza del número de actos motores. Es un síntoma muy invalidante presente en un buen porcentaje de pacientes cirróticos (Spahr et al., 1996, Jones y Weissenborn, 1997, Jover et al., 2005). La aquinesia afecta a algunos movimientos elaborados como la escritura, el lenguaje oral (disartria acinética), el balanceo normal de los brazos al andar, la expresión facial (faz inexpresiva y con disminución del parpadeo) (Ferenci et al., 2002).

● **Bradiquinesia:** enlentecimiento o reducción progresiva de la velocidad y amplitud de los movimientos repetitivos. En una persona no afectada los movimientos automáticos se desarrollan de forma involuntaria y subconsciente. En los pacientes con cirrosis hepática se han descrito retrasos en la iniciación motora, debilidad y fatigabilidad al reiterar los movimientos y enlentecimiento en la realización de las tareas. Esto afecta muchos aspectos motores de su vida diaria, como vestirse, asearse, comer, actividades manuales, etc., exigiéndoles su ejecución mucho más tiempo del que para ellos era habitual. El enlentecimiento psicomotor es uno de los primeros síntomas de la encefalopatía hepática (Spahr et al., 1996, Jones y Weissenborn, 1997). Incluso en pacientes con encefalopatía hepática mínima, es posible observar bradiquinesia (Joebges et al., 2003).

● **Asterixis:** Es el temblor más característico que presentan los pacientes con EH (“flapping tremor”) (Uribe et al., 1980, Jones y Weissenborn, 1997, Timmermann et al., 2002, 2004, 2005, Paul et al., 2004). Los pacientes sufren sacudidas repentinas e involuntarias de un músculo o grupo de músculos causadas por contracciones musculares repentinas que no pueden ser controladas por la persona que las padece.

● **Rigidez:** es otro de los síntomas que pueden presentar los pacientes con EH (Jones y Weissenborn, 1997, Jover et al., 2003). Consiste en una contractura permanente de las masas musculares, que se traduce en una dificultad creciente para la movilización pasiva de las articulaciones.

●**Alteraciones de la postura:** los pacientes con EH también pueden presentar trastornos posturales y de la marcha (Burkhard et al., 2003, Mechtcheriakov et al., 2005).

2.2.4. Otras alteraciones neuropsiquiátricas

Además de las alteraciones cognitivas y motoras se pueden observar en pacientes con EH otras alteraciones neuropsiquiátricas. Se han descrito irritabilidad, apatía, trastornos de la conducta, cambios en el apetito, mirada fija, amnesia, cambios en el temperamento y en la personalidad. Algunos pacientes pasan de la depresión a la euforia en pocos minutos. Otros pacientes presentan sólo depresión o euforia alternadas con un temperamento estable. Los síntomas paranoicos suelen ser comunes durante el estupor como resultado de las dificultades en la percepción y la interpretación. También pueden aparecer alucinaciones (Sherlock et al., 1954).

Un 50% de los pacientes con cirrosis hepática presentan alteraciones del sueño caracterizados por somnolencia durante el día, sobre todo a primeras horas, letargia y sopor, mientras que durante la noche la calidad del sueño está disminuida, duermen menos tiempo y el sueño está fragmentado (Cordoba et al., 1998).

2.3. Factores implicados en la EH clínica y mínima

En el desarrollo de la encefalopatía hepática (tanto clínica como mínima) están implicadas diversas alteraciones, descritas a continuación, las cuáles pueden actuar de forma sinérgica.

2.3.1. Hiperamonemia

El amonio es esencial en la homeostasis del nitrógeno y participa en la síntesis de importantes compuestos pero a concentraciones elevadas en sangre y cerebro, resulta tóxico, provocando alteraciones funcionales en el sistema nervioso central (Gerok y Haüssinger, 1984, Cooper, 1993, Felipe y Butterworth, 2002). Por ello, los niveles de amonio en sangre y en cerebro se encuentran estrictamente regulados por distintas reacciones que mantienen el equilibrio entre su formación y su eliminación.

Los mecanismos patogénicos de la encefalopatía hepática no están bien establecidos. Sin embargo, parece claro que la hiperamonemia es uno de los principales responsables de este

proceso. Existen datos experimentales y clínicos que apoyan el papel de la hiperamonemia en el desarrollo de la encefalopatía hepática:

1.- Los factores desencadenantes de la EH y del coma hepático en pacientes cirróticos van asociados a un aumento de los niveles de amonio.

2.- El funcionamiento del hígado en las deficiencias congénitas del ciclo de la urea es normal, excepto en la detoxificación del amonio. En estas situaciones también se produce encefalopatía hepática. Los niños nacidos con hiperamonemia debida a una deficiencia congénita en el ciclo de la urea, presentan retraso mental y el grado del mismo se correlaciona con el nivel y la duración de la hiperamonemia neonatal (Msall et al., 1984).

3.- Los tratamientos clínicos que revierten la EH van dirigidos a reducir los niveles de amonio: reducción de la ingesta proteica, control de la flora bacteriana intestinal productora de amonio mediante antibióticos o reducción de la absorción del amonio intestinal mediante acidificación del lumen con lactulosa o lactitol.

4.- Existe una buena correlación entre la severidad de los síntomas neurológicos en los pacientes y la concentración arterial de amonio que presentan (Clemmesen et al., 1999).

5.- La neuropatología que se manifiesta en la encefalopatía hepática es similar a la observada como consecuencia de la exposición del cerebro a niveles altos de amonio. Tanto en EH aguda como en la exposición aguda a amonio en los modelos animales, los astrocitos se hinchan provocando edema cerebral. Esta complicación se presenta en pacientes con síndromes hiperamonémicos agudos (fallo hepático agudo, síndrome de Reye, enzimopatías congénitas del ciclo de la urea, etc.) y se correlaciona con los niveles de amonio alcanzados en esos pacientes (Clemmesen et al., 1999).

En la EH crónica y en la exposición crónica a amonio, los astrocitos sufren alteraciones morfológicas y funcionales similares, apareciendo los denominados astrocitos de Alzheimer tipo II. Estas alteraciones se observan tanto en pacientes con fallo hepático crónico como en pacientes con hiperamonemia crónica debida a enzimopatías congénitas del ciclo de la urea (Michalak y Butterworth, 1997), en ratones con hiperamonemia inducida por inyección de ureasa (Gibson et al., 1974) y en cultivos de astrocitos expuestos a amonio (Norenberg, 1987).

Todos los datos anteriores apoyan que la hiperamonemia juega un papel esencial en el desarrollo de la EH.

2.3.2. Inflamación

La inflamación es una respuesta biológica del organismo frente a un estímulo externo considerado patológico. Por lo tanto, es un mecanismo de defensa cuya función principal es eliminar el origen del daño, sin embargo, no siempre es una respuesta beneficiosa. En ciertas enfermedades, el sistema inmunológico puede atacar a sus propias células provocando respuestas inflamatorias dañinas y llevando al organismo a un estado de inflamación crónica.

2.3.2.1. Inflamación en pacientes con EH. Sinergia entre hiperamonemia e inflamación.

En pacientes con fallo hepático agudo, la inflamación periférica está asociada con la progresión de la EH (Rolando et al., 2000). La hiperamonemia y la inflamación actúan sinérgicamente en la inducción y el grado de severidad de la EH.

Existe una correlación entre los niveles séricos de TNF α (citocina proinflamatoria) y la severidad de la EH en pacientes con fallo hepático crónico. Los pacientes en grado I de EH presentan concentraciones de TNF α más bajas que los que están en grado II, siendo los pacientes en grado IV los que muestran las concentraciones séricas de TNF α más altas (Odeh et al., 2004).

Shawcross et al. (2004) demostraron que la inflamación agrava las alteraciones neurológicas producidas por la hiperamonemia en pacientes cirróticos. Administraron a pacientes cirróticos una solución de aminoácidos para inducir hiperamonemia, la cual provocó un deterioro de la función neuropsicológica (evaluada mediante test psicométricos) cuando los pacientes presentaban inflamación pero no tras la resolución de la misma. Estos datos indican que la inflamación y la hiperamonemia tienen efectos sinérgicos en la inducción de las alteraciones neurológicas en EH. Estos mismos investigadores, comprobaron posteriormente que la inflamación determina el grado de severidad de la encefalopatía en pacientes cirróticos con EH avanzada. Los niveles de inflamación eran superiores en pacientes con EH en grado 4 respecto a los de grado 3, mientras que los niveles de amonio eran similares en ambos grupos (Shawcross et al., 2011).

En 2012 (a) Felipo et al. llevaron a cabo un estudio con pacientes de diferentes etiologías que presentaban distinto grado de hiperamonemia e inflamación. Concluyeron que en pacientes con enfermedades hepáticas, el deterioro cognitivo puede aparecer antes si los niveles de hiperamonemia e inflamación son los suficientemente elevados y que uno de estos factores por

sí solo, no provoca deterioro cognitivo, es necesaria la combinación de ambos y un cierto nivel para provocar un deterioro en la cognición, incluso en pacientes sin enfermedad hepática.

Montoliu et al. (2009) mostraron que la IL-6 e IL-18 están aumentadas en pacientes cirróticos con EHM comparadas con pacientes sin EHM y que existe una correlación entre los niveles de IL-6 e IL-18 en suero y el grado de EHM. Los pacientes con niveles más altos de IL-6 e IL-18 presentaron un peor resultado en la batería de test psicométricos realizados en el estudio, sugiriendo que alteraciones relacionadas con la IL-6 e IL-18 podrían contribuir al deterioro cognitivo en la EHM y que sus concentraciones en sangre podrían ser útiles para distinguir pacientes cirróticos con y sin EHM.

2.3.3. Neuroinflamación

El cerebro está protegido de influencias externas por la barrera hematoencefálica (BHE). Cuando se produce una infección las citocinas no pueden atravesar la BHE directamente, por lo tanto son incapaces de producir un efecto directo en el cerebro. No obstante, el sistema inmune es capaz de transmitir señales al cerebro para que produzca una respuesta durante los procesos inflamatorios. La respuesta inmunitaria del SNC se produce fundamentalmente por la activación de la microglía, considerada como los macrófagos residentes del SNC (Bentivoglio et al., 2011). La microglía es muy sensible a los cambios que suceden en su entorno, constituyendo la primera línea defensiva del cerebro frente a una agresión (Lehnardt, 2010). La microglía activada se acumula en las zonas dañadas y expresa genes relacionados con la inflamación, produciendo citocinas proinflamatorias, enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y nitrosativo, moléculas de adhesión y radicales libres (González-Scarano y Baltuch 1999, Block et al., 2007).

Los astrocitos también participan en la respuesta inmunológica del SNC frente a agresiones. La activación de astrocitos se produce de forma gradual con cambios progresivos que influyen a las neuronas vecinas y a células no neuronales (Sofroniew y Vinters 2010). Los astrocitos activados secretan citocinas y quimiocinas participando en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Farina et al., 2007).

2.3.3.1. Neuroinflamación en pacientes con EH

Los estudios sobre neuroinflamación en EH se han iniciado recientemente, por lo que todavía existen pocos estudios en humanos. Cagnin et al. (2006) utilizaron la tomografía de

emisión de positrones (PET) en 5 pacientes cirróticos con EHM. Uno de los mecanismos propuestos como causante de la pérdida de función cerebral en los pacientes con EH es la desregulación de la síntesis de neuroesteroides. Esta desregulación está relacionada con un receptor (antes llamado "*peripheral type benzodiazepine receptor*" (PBBS) que ahora se conoce con el nombre de "*translocator protein*" (TSPO)) que se expresa en células gliales activadas y puede ser medido *in vivo* por su unión a un ligando específico marcado con C¹¹ mediante la técnica de PET. En el estudio de Cagnin et al. (2006) concluyen que la EH se asocia con el aumento de la detección de este ligando en el cerebro de pacientes, reflejando un aumento del receptor TSPO, sugiriendo la idea de una activación mayor en las células gliales de pacientes con EH.

Se ha demostrado que existe un aumento de la expresión de TSPO en cerebro de pacientes cirróticos fallecidos por coma hepático (Lavoie et al. 1990). El aumento de TSPO en EH crónica podría ser consecuencia de una activación de la microglia aunque esto no se ha estudiado en humanos.

El principal cambio patológico en cerebro en EH crónica se caracteriza por la presencia de astrocitos de Alzheimer tipo II (Solitare, 1972, Martin et al., 1987) que se caracterizan por el ensanchamiento celular y la falta de citoplasma. El edema cerebral y el aumento de la presión intracraneal suponen un daño que ocurre en el 80% de los pacientes con EH crónica (Lee, 2012, Jalan et al., 2004, Larsen et al., 2000) y representa la causa más frecuente de mortalidad en estos pacientes (70% de mortalidad) (Lee, 2012, Jalan et al., 2004, Larsen et al., 2000, Shawcross y Wendon, 2012).

Estudios recientes apoyan la idea de que la EH en enfermedades hepáticas crónicas está causada por una alteración en la comunicación neuronal, resultado de una neurotransmisión alterada (Felipo, 2013).

El fallo en la comunicación neuronal se ha comprobado mediante estudios de electroencefalografía, mostrando una menor activación neuronal relacionada con los déficits de atención en pacientes con EHM (Felipo et al., 2012b).

La presencia de inflamación, tanto periférica como central, se ha visto que contribuye a las anomalías neuro-comportamentales observadas en EH crónica (Jayakumar et al., 2015).

Estos estudios muestran que la neuroinflamación juega un papel esencial en el deterioro cognitivo y motor en la EH.

3. El sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria

3.1. Visión general del sistema inmunitario

El sistema inmunitario es el encargado de proteger al organismo frente a infecciones y agresiones, tanto de origen externo como propias del sujeto. Está compuesto por un conjunto de células especializadas y una serie de factores que participan en la defensa contra el agente patógeno. Existen dos líneas de defensa principales, la respuesta innata y la respuesta adaptativa. Ambas se encargan de detectar y eliminar el patógeno discriminando lo propio de lo ajeno y cooperan de manera eficiente permitiendo la comunicación célula-célula mediante receptores de superficie y mensajeros solubles, denominados citocinas. La respuesta innata estimula y modula la respuesta adaptativa, y la respuesta adaptativa potencia la actividad de la respuesta innata (Chaplin, 2010).

3.2. Papel de los diferentes tipos de leucocitos en sangre

Las células del sistema inmune pueden dividirse, de forma general, en dos categorías funcionales según el tipo de respuesta en la que participen: la respuesta innata y la respuesta adaptativa (Hoebe et al., 2004).

La inmunidad innata es un sistema de defensa que ha ido evolucionando hasta reconocer patrones conservados característicos de diversos patógenos y suele ser la primera línea de defensa. La inmunidad adaptativa, por el contrario, es una innovación evolutiva más reciente y permite una respuesta inmunitaria más compleja, así como la llamada “memoria inmunológica” (Netea et al., 2016). La respuesta inmunitaria adaptativa es específica de los anticuerpos y requiere el reconocimiento de antígenos que no son propios durante un proceso llamado presentación de antígenos. La especificidad del antígeno permite la generación de respuestas que se adaptan a patógenos específicos o a las células infectadas por estos patógenos (Male et al., 2013).

Las células que participan en el sistema inmunitario innato son los monocitos/macrófagos, los granulocitos polimorfonucleares, los linfocitos *natural killer* o NK, los mastocitos y las plaquetas.

Los monocitos de circulación periférica, los macrófagos (diferenciados de los monocitos y que residen en los tejidos) y los granulocitos polimorfo-nucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) se encargan de la función fagocíticas principalmente frente a microbios extracelulares.

Los linfocitos NK participan fundamentalmente en la defensa contra a microorganismos intracelulares y son responsable de la muerte de las células infectadas por virus.

Los mastocitos y plaquetas son indispensables en la inducción y el mantenimiento de la inflamación.

Un grupo especializado de células denominado células presentadoras de antígeno (CPA) sirve de puente entre la respuesta innata y la adaptativa. Capta y procesa antígenos de manera que puedan ser reconocidos por los linfocitos T mediante receptores específicos (Male et al., 2013).

Las células encargadas de la respuesta adaptativa son los linfocitos. Tanto los linfocitos T como B reconocen a los antígenos a través de receptores muy específicos para el antígeno que se expresan de forma clonal (MacDonald et al., 1993). Los linfocitos se diferencian y maduran a través de células troncales en los llamados órganos linfáticos primarios y una vez que pasan su fase de diferenciación independiente de antígeno, emigran por torrente sanguíneo hasta actuar en los órganos linfáticos secundarios. Aquí pasan de ser linfocitos *naive* a ser linfocitos efectores tras el reconocimiento del antígeno específico (Chaplin, 2010). Los linfocitos T y B efectores se convertirán en los responsables de las respuestas inmunitarias celulares y humorales, respectivamente.

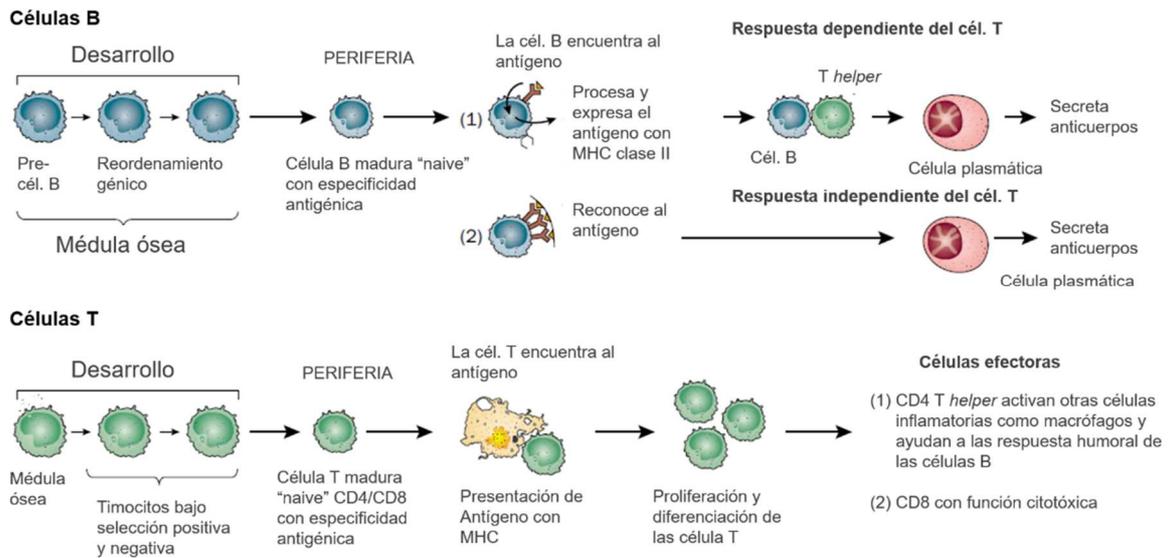


Figura. 1. Esquema del desarrollo de los linfocitos B y linfocitos T. (Modificado de Parkin y Cohen, 2001). MHC, Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

3.2.1. Respuesta humoral: papel de los linfocitos B

Los linfocitos B son productores de anticuerpos para neutralizar toxinas, prevenir que los microorganismos patógenos se adhieran a las mucosas, activar el complemento y ayudar en la fagocitosis y en la citotoxicidad, entre otras funciones.

Los anticuerpos son secretados por las células B maduras, pero durante el desarrollo de estas células, actúan como moléculas de membrana, haciendo el papel de receptor. Así, son capaces de internalizar los antígenos y procesarlos para presentárselos a los linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En este caso sería una respuesta dependiente de células T. Otro tipo de respuesta, independiente de linfocitos T, vendría efectuada por los linfocitos B cuando los antígenos tienen numerosos epítopos repetidos que se unen a los receptores IgM de las células B activando directamente la secreción de inmunoglobulinas. Sin embargo, al no haber formación del centro germinal, ni una maduración, ni afinidad por un antígeno específico, no habría generación de células de memoria que confieren inmunidad a largo plazo.

Los linfocitos B inmaduros expresan IgM específicas de antígeno, una vez que maduran, también pueden expresar en su superficie otros tipos de inmunoglobulinas, como IgD, y una vez que se forman las células plasmáticas, producen una gran cantidad de Igs, sobre todo IgG, IgA e IgE. (Chaplin, 2010).

3.2.2. Respuesta celular: papel de los linfocitos T

Los linfocitos T tienen en su membrana una serie de receptores asociados al complejo CD3 para desencadenar una vía de señalización celular cuando el antígeno se une a su receptor. La agregación del receptor causa una fosforilación de tirosinas en la cola citoplásmica del complejo CD3 y la transducción de señales hacia el núcleo permite la activación de genes implicados en la proliferación de los linfocitos T. Así es como sucede la respuesta celular.

Las células dendríticas son las estimuladoras más potentes de los linfocitos T *naive*. Mediadores inflamatorios inducen la expresión de moléculas coestimuladoras, lo cual hace que aumente la probabilidad de que ocurra la presentación antígeno-receptor de los linfocitos T (Chaplin, 2010).

Los linfocitos T maduros se producen en el timo y se liberan al torrente sanguíneo. Estas células se consideran inmunológicamente *naive* hasta el momento en que se encuentran con una célula presentadora de antígeno (CPA) y se produce la llamada sinapsis inmunológica entre el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el receptor de célula T (TCR). También se producen otras uniones entre el linfocito y la CPA para aumentar el estímulo, estas son las moléculas coestimuladoras, como el receptor CD28. El reconocimiento del antígeno da pie a la proliferación de las células T y su diferenciación a células efectoras. Una vez que la infección o el daño han sido eliminados, no conviene mantener el mismo número de linfocitos efectoras en sangre, por lo que la mayoría de los linfocitos T activados mueren por apoptosis. Sin embargo, un porcentaje de ellos sobrevive y mantiene una especificidad por el antígeno mucho más elevada que las células *naive*. Esto es lo que da efectividad y rapidez a una segunda respuesta inmune tras la primera activación. Estas células que mantienen una memoria inmunológica son los linfocitos T de memoria.

Los linfocitos T *naive* y de memoria se distinguen, además de por su funcionalidad, por los marcadores que expresan en membrana, como en el caso del receptor CD45, que puede presentar diferentes isoformas. En el caso de los linfocitos T *naive* humanos, se detecta principalmente la isoforma CD45RA. Durante el curso de la activación celular, los linfocitos T cambian la expresión del receptor y pasan a expresar la isoforma CD45RO (Berard y Tough, 2002)

Los linfocitos CD45RO+ además, pueden dividirse en dos subpoblaciones, los CD62L+CCR7+ también llamados de memoria central y los CD62L-CCR7- también llamados de memoria efectora (Sallusto et al., 1999).

Los linfocitos de memoria central son capaces de entrar en los nódulos linfáticos a través de las células endoteliales y exhiben unas características de función migratoria parecida a las células *naive*, mientras que las de memoria central, expresan receptores *homing* que les permiten entrar en tejidos no linfoides (Mackay et al., 1990).

Por lo tanto, los linfocitos T de memoria central y efectora, proporcionan funciones complementarias ante una segunda infección, donde las efectoras tienen una respuesta local inmediata y las de memoria central generan rápidamente un gran número de efectoras desde los órganos linfoides secundarios (Berard y Tough, 2002).

Los linfocitos T efectores se dividen, principalmente, en dos tipos, los T *helper* (Th) positivos para CD4 y los T citotóxicos positivos para CD8, en función de la molécula de superficie que exprese. Los Th CD4+ a su vez, se diferencian en varios tipos de linfocitos efectores en función de las citocinas inductoras que haya en el medio y se caracterizan por el patrón de citocinas que secretan y por la expresión de factores de transcripción específicos (Zhu et al., 2010). Juegan un papel fundamental en el reconocimiento del antígeno y la activación de otros tipos celulares mediadores de la respuesta inmune, entre ellos los linfocitos B, encargados de la respuesta humoral.

Los citotóxicos CD8+ se encargan de la actividad antiviral y antitumoral. Tienen actividad citotóxica directamente sobre la célula diana, uniéndose a ella por receptores específicos que reconocen partes de antígenos de células patogénicas y llevándola a la muerte celular a través de una serie de enzimas, como las perforinas. (Chaplin, 2010).

La mayoría de linfocitos CD4 son CD28+ y requieren la participación del TCR para su activación, y la del CD28 como coestimulador. Sin embargo, hay una población de CD4+CD28- que poseen una habilidad proinflamatoria sin la necesidad de la estimulación por una CPA. Además, esta población está implicada en procesos inflamatorios en varias enfermedades como la aterosclerosis, infecciones virales crónicas o procesos autoinmunes (Broux et al. 2012a, Maly y Schirmer 2015).

En estados patológicos, la población de CD4+CD28- representa una senescencia celular prematura debido a una activación persistente, por lo que el aumento de esta población se puede considerar como un biomarcador de inmunosenescencia temprana (Vallejo et al. 2004).

Además, esta población de linfocitos CD4 tiene características distintas al resto de los CD4 helper ya que tienen un fenotipo citotóxico, propio de los CD8, y son capaces de producir

perforinas y granzimas B que pueden lisar células endoteliales y dañar el tejido. También, pueden secretar grandes cantidades de TNF α y de IFN γ promoviendo un ambiente proinflamatorio (Dumitriu, 2015, Maly y Schirmer 2015, Dumitriu et al., 2009).

Se diferencian, además, de las CD4+CD28+ en que expresan en su membrana el receptor CX3CR1 (Broux et al., 2012b) por lo que mediante quimio-atracción, van a migrar a sitios con un gradiente alto de CX3CL1, ligando que recibe también el nombre de fractalkina, que es producida, entre otras, por células endoteliales (Jones et al., 2010).

Teniendo en cuenta las características de este tipo celular, no es de extrañar que se hayan encontrado infiltraciones de CD4+CD28- en cerebro de pacientes con esclerosis múltiple (Broux et al., 2012b, Scholz et al., 1998). Esta infiltración estaría mediada por el CX3CR1/CX3CL1 y amplificada por la IL-15, la cual también amplifica las propiedades patogénicas de esta subpoblación de CD4+CD28- (Broux et al., 2015).

Los CD8 también pueden carecer de la molécula coestimuladora CD28. Esta población de CD8+CD28- se caracteriza por una baja capacidad proliferativa y son llamadas CD8 reguladoras. Tienen capacidad supresora como las CD4 T reguladoras pero se diferencian de ellas en que funcionan predominantemente a través de la acción de mediadores solubles, como la IL-10 y el TFG β (Ceeraz et al., 2013, Arosa, 2002). Cada vez más evidencias apoyan la idea de un papel regulador para las CD8+CD28- en la supresión inmune de patologías como cáncer (Filaci et al., 2007) o enfermedades autoinmunes (Tulunay et al., 2008).

3.2.2.1 Diferenciación de los linfocitos T *helper* CD4

A continuación detallamos, en el esquema, los tipos de linfocitos CD4, las citocinas que los inducen, las que secretan y sus principales factores de transcripción.

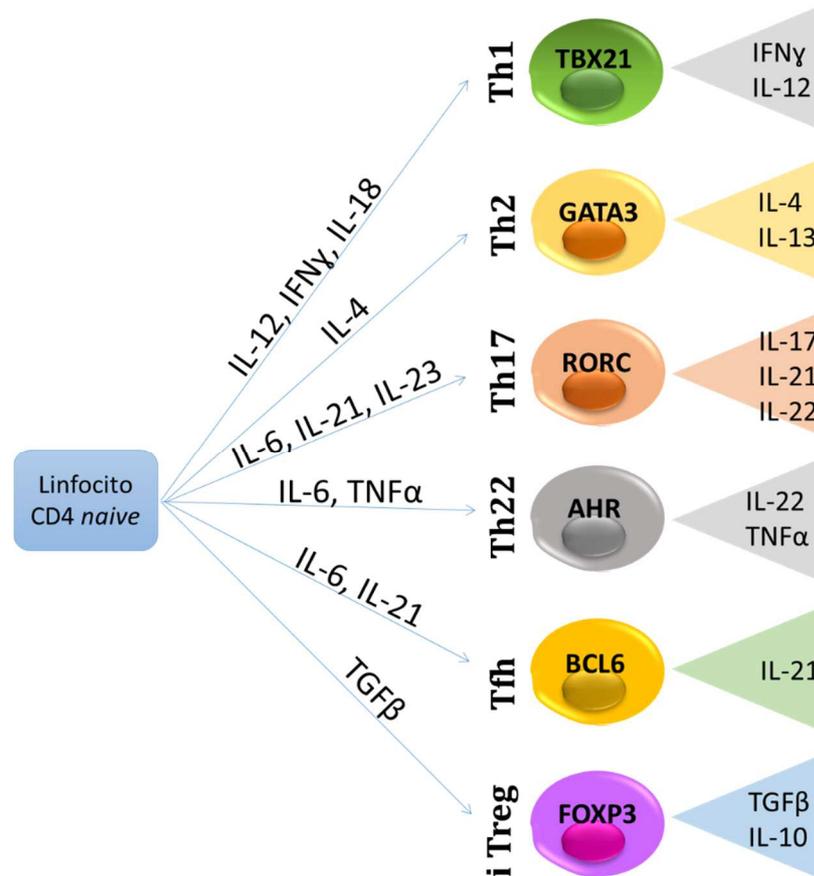


Figura. 2. Linfocitos CD4 efectores. Se muestran las interleucinas que inducen la diferenciación de cada subtipo celular, el factor de transcripción característico y la producción de las principales interleucinas de cada subpoblación.

En cuanto a la función que desempeña cada uno, también existen diferencias muy notables.

Los **Th1** juegan un papel dominante en la protección contra infecciones bacterianas y reconocen agentes infecciosos intracelulares. Producen interleucinas que incluyen la proliferación de otras células T, incluida la acción paracrina de las propias Th1 y también de las CD8 citotóxicas. Además son productoras del interferón gamma (IFN γ) que activa macrófagos para eliminar patógenos intracelulares como micobacterias, hongos o protozoos. (Zhu et al., 2010, Zhu y Paul, 2010). En la Figura 2 vemos el TBX21 como factor de transcripción característico de los TH1.

Los **Th2** producen IL-4, IL-5 e IL-13 que favorecen la producción de anticuerpos y la expansión de eosinófilos. Su factor de transcripción característico es GATA3. La respuesta de los Th2 se asocia a patógenos extracelulares, helmintos y alergias. Por otra parte, la respuesta mediada por IL-4 se considera antiinflamatoria ya que bloquea la síntesis de citocinas

proinflamatorias como la IL-1, TNF α , IL-6 y el MIP (macrophage inflammatory protein) (Zhu y Paul, 2010).

Los **Th17** se caracterizan por su papel en la defensa contra organismos patógenos, sobre todo bacterias extracelulares y hongos y por su desencadenamiento de procesos inflamatorios en enfermedades autoinmunes (Noack y Miossec, 2014). También se les ha relacionado con el mantenimiento del tejido epitelial y afectaciones de la barrera intestinal. (Blaschitz y Raffatellu, 2010). Producen principalmente IL-17 capaz de provocar una reacción de inflamación masiva en tejido debido a la gran distribución de los receptores de esta interleucina. Se han detectado receptores para la IL-17 en casi todos los tipos de células del hígado, incluyendo hepatocitos, células de Kupffer, células epiteliales biliares y endoteliales (Ge y You, 2008). En la diferenciación de los TH17 se activan factores de transcripción como RORC y STAT3. En artículos como el de Huppert et al. en 2010, se demuestra que los Th17, a través de la IL-17, son capaces de afectar a la integridad de la barrera hemato encefálica, a través de mecanismos que implican un aumento de las especies reactivas del oxígeno y como consecuencia, una disminución de proteínas de unión entre las células endoteliales de la BHE. También secretan IL-21 e IL-22, aunque estas son características de otros tipos celulares de CD4 efectores. (Korn et al., 2009, Rutz et al., 2013).

Los **Th22** se definen por la producción de la interleucina con el mismo nombre (IL-22), además de secretar TNF α e IL-13. Sin embargo, investigaciones en los últimos años indican que la IL-22 puede ser producida por varios tipos de linfocitos T activados, incluyendo a los Th22, Th17, Th1 y algunas células no linfoides (Jia y Wu 2014). Los CD4 *naive* adquieren un fenotipo de Th22 en presencia de IL-6 y TNF α , fomentado por la IL-1 β y se inhiben en presencia de altas concentraciones de TGF β (Duhon et al., 2009). Los Th22 sin embargo, no producen IL-17, ni IFN γ . Se definen también por la expresión del factor de transcripción *aryl hydrocarbon receptor* (AHR), apenas indetectable en otros CD4 efectores como Th17 o Th1. Otra similitud con los Th17 es que expresa en membrana el receptor CCR6, cuyo ligando, el CCL20 (Schutyser et al., 2003), atrae por quimioatracción a estos tipos celulares hacia epitelios inflamados y juegan diferentes papeles en formación de tumores, daños en piel y órganos digestivos y en enfermedades inflamatorias (Paulissen et al., 2015).

Los **Tfh** o **T helper foliculares** tienen como función principal ayudar a los linfocitos B a producir anticuerpos en respuesta al reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T. También inducen y controlan los cambios en la trasposición y en la hiperpermutación somática de la formación de inmunoglobulinas (Ma et al., 2014). Esto ocurre principalmente en los centros

germinales. Además, los Tfh son productores, fundamentalmente, de la IL-21 cuya función es la estimulación de la diferenciación de los linfocitos B en células formadoras de anticuerpos a través del receptor de la IL-21 (King et al., 2008). Expresan BCL6 como factor de transcripción característico.

Las **Treg** o **T reguladoras** son una población de linfocitos efectores cuya función principal es la supresión de la actividad deletérea de otros linfocitos T. Participan en otras funciones como la prevención de enfermedades autoinmunes manteniendo la tolerancia a lo propio (Kleinewietfeld y Hafler, 2014). Secretan principalmente TGF β e IL-10 aunque estas citocinas no son específicas de este tipo celular ya que son secretadas por otras muchas células del sistema inmune. (Corthay, 2009). Expresan FoxP3 como factor de transcripción característico.

Además, de interés notable para este trabajo es el hecho de que las T reguladoras estén relacionadas con el deterioro cognitivo de ciertas enfermedades que cursan con inflamación. En experimentos con modelos animales, como en el artículo de Nguyen et al. (2012) estudian el papel de las T reguladoras como moduladoras del comportamiento patológico de ratones con daño hepático. Comparando un modelo donde se lleva a cabo la depleción de las T reguladoras y después infundiendo de nuevo este tipo celular, llegan a la conclusión de que las T reguladoras restauran el comportamiento patológico de los ratones a través de la inhibición de monocitos circulantes y de la producción de IL-6, con su subsiguiente señalización a través del endotelio cerebral.

En otro artículo, Dansokho et al. (2016), el aumento de T reguladoras en modelos animales de Alzheimer, restaura la función cognitiva asociada a la enfermedad, sugiriendo un papel beneficioso de las T reguladoras en la patofisiología de esta enfermedad.

3.2.3. Papel de los monocitos y macrófagos

Los monocitos son uno de los tipos celulares encargados de mediar la inflamación y la defensa innata. Recientemente, se han definido tres tipos de monocitos en sangre periférica en función de los marcadores de superficie CD14 y CD16 (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

- CD14⁺⁺CD16⁻: también llamado clásicos, tienen actividad fagocítica y anti microbiana pero una baja producción de citocinas. Constituyen el 90-95% de los monocitos circulantes.
- CD14⁺⁺CD16⁺: también llamados intermedios, tienen actividad proinflamatoria y producen activamente TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-23. Constituyen sobre un 5% de los monocitos circulantes.

- CD14+CD16++: también llamados no-clásicos, tienen actividad antiinflamatoria y producen principalmente IL-10. Constituyen el otro 5% de los monocitos circulantes.

En condiciones de inflamación, los monocitos migran de la sangre al tejido siguiendo una señalización de quimio-atracción por factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias. Una vez en el tejido, se diferencian a macrófagos (Shi y Palmer, 2011). En función del ambiente, los monocitos se van a diferencias en macrófagos de tipo M1 o proinflamatorios, o de tipo M2 o antiinflamatorios (Boscá et al., 2015).

Los macrófagos tipo M1 se diferencian en presencia de INF γ , LPS o TNF y expresan enzimas como la iNOS (Óxido Nítrico Sintasa inducible) (Ghosh et al., 2015) y la cGKII (Kinasa II dependiente de GMPC) (Liao et al., 2015). Los de tipo M2 se diferencian en presencia de IL-4, IL-13 o IL-10 y hay varios subtipos en función de las rutas metabólicas que se desencadenen. En general tienen respuestas antiinflamatorias y expresan enzimas como la arginasa-1 (Hardbower et al., 2016).

Los macrófagos interactúan con los linfocitos T para activarlos en órganos diana y a su vez, ellos mismos se activan por las citocinas producidas por los linfocitos T, principalmente el TNF α (Khera et al., 2012, Raveney et al., 2010). Con ello, los macrófagos producen metabolitos secundarios tóxicos como el óxido nítrico, que puede matar a las células del su alrededor. Finalmente tiene función fagocítica, y esas mismas proteínas fagocitadas, pueden presentarlas a los linfocitos, actuando los macrófagos como células presentadoras de antígenos.

3.3. Mecanismos implicados en la inflamación periférica

3.3.1. Marcadores de la inflamación: CD69

El CD69 es conocido como una molécula de activación temprana y es miembro de una familia de receptores de membrana implicados en la transducción de señales en los procesos de inflamación. La expresión de CD69 en humanos es inducida en la mayoría de los linajes hematopoyéticos, incluyendo linfocitos B y T, NKs o neutrófilos, mientras que se expresa constitutivamente en monocitos, plaquetas y ciertas células epidérmicas (Marzio et al., 2008).

La bibliografía ha descrito siempre al CD69 como un marcador de activación leucocitaria, relacionado con la activación de diferentes subtipos de linfocitos y con la patogénesis de la inflamación crónica.

Sin embargo, investigaciones más recientes han propuesto nuevos roles para el CD69. En ciertos estudios (Martín y Sánchez, 2011, Martín et al., 2010) se ha demostrado que el CD69 actúa como un regulador negativo de la diferenciación de los linfocitos proinflamatorios Th17. Ratones deficientes para CD69, en estos artículos, han mostrado una mayor capacidad de diferenciación de los linfocitos CD4 de memoria a Th17 tanto *in vivo* como *in vitro*.

Experimentos funcionales y bioquímicos (González-Amaro et al., 2013) han demostrado que cuando existe una señal específica del antígeno captada a través de los receptores de linfocitos T, se induce la expresión de CD69 en membrana y esto activa STAT5, un represor negativo de la diferenciación de los Th17. Sin embargo en ausencia de CD69, STAT3 es el que prevalece actuando como activador de la expresión del RORC y con ello, la diferenciación de los Th17.

Por lo tanto, se propone al CD69 como un regulador de la balanza que existe entre linfocitos proinflamatorios, Th17 y antiinflamatorios, Treg en humanos, lo que muestra al CD69 como una diana terapéutica importante para enfermedades que cursan con una desregulación del sistema inmune (González-Amaro et al., 2013).

Además de esta actuación en la diferenciación de linfocitos, el CD69 tiene otro papel importante en la distribución de estos tipos celulares. Estudios como el de Shioh et al. en 2006, proponen al CD69 como regulador negativo de la salida de linfocitos desde órganos secundarios a periferia, lo que estaría implicado un cambio en la localización de los subtipos linfocitarios en sangre y la permanencia de células de memoria en los órganos linfoides secundarios.

Los linfocitos CD4 de memoria son cruciales para el mantenimiento de la inmunidad adquirida. La mayoría de ellos residen en nichos estromales de medula ósea hasta que se requiere su salida a la circulación periférica (Shinoda et al., 2012). En este artículo del 2012, los investigadores demuestran que ratones deficientes para CD69 tienen linfocitos CD4 efectorales incapaces de trasladarse en medula ósea y permanecer allí para diferenciarse a células de memoria. Como consecuencia, no se producen anticuerpos de alta afinidad, ni células plasmáticas de memoria. Con esto demuestran que el CD69 es crítico para la generación y el mantenimiento de linfocitos T de memoria.

Teniendo en cuenta las múltiples funciones en las que puede estar implicado el CD69 en linfocitos, es importante distinguir entre una expresión temprana en células CD4 *naive*, que está asociada a una activación aguda en la célula y la expresión del CD69 en células CD4 de memoria, que se asocia a un estado de *resting* de la célula en el nicho folicular (Schoenberger, 2012).

3.3.2. Mediadores de la inflamación: las citocina

En este trabajo estudiamos, principalmente, las citocina, como mediadoras de la inflamación periférica.

La principales citocina proinflamatorias que participan en la respuesta inflamatoria son el factor de necrosis tumoral α o TNF α , la IL-6 y la IL-1 β , así como las IL-12 e IL-18. También interferones como el gamma (IFN γ). Además interleucinas proinflamatorias más específicas de ciertos procesos inflamatorios son la IL-17, IL-21 e IL-23 y la citocina CCL20.

Las principales interleucinas antiinflamatorias son la IL-4, la IL-13 y la IL-10. También el *transforming growth factor beta* (TGF β) aunque tiene funciones aparentemente contrarias en función de su concentración.

Las células que producen **TNF α** son principalmente monocitos/macrófagos, linfocitos T, neutrófilos, mastocitos y células endoteliales (Feldmann et al., 2001). *In vivo*, la citocina que se secreta al principio del proceso inflamatorio es el TNF α cuyos niveles séricos en ratones aumentan 30 minutos después de un estímulo inflamatorio (Tracey et al., 1987). Si se bloquea la liberación de TNF α en respuesta a un estímulo inflamatorio *in vivo*, la expresión de otras citocina como IL-1 o IL-6 se reduce (Fong et al., 1989), sugiriendo que TNF α es esencial para la iniciación o amplificación de la liberación de IL-1 e IL-6. Este dato junto con experimentos análogos *in vitro* (Brennan et al., 1989) indican que el TNF α coordina la respuesta de citocina tras un daño. El TNF α induce diversas quimiocinas y moléculas de adhesión (Doukas y Pober, 1990), lo que acelera la atracción de leucocitos inflamatorios al lugar del daño y la liberación de más TNF α . Además el TNF α aumenta la función del sistema inmune aumentando la proliferación de linfocitos T, aunque exposiciones excesivamente prolongadas al TNF α producen inmunosupresión (Yokota et al., 1988, Gordon y Wofsy, 1990).

Las interleucinas (ILs) son una familia de polipéptidos pertenecientes al grupo de citocinas. Son secretadas principalmente por leucocitos. Su principal función es regular las funciones relacionadas con este tipo de células: activación, diferenciación o proliferación celular, secreción de anticuerpos, quimiotaxis y regulación de otras citocinas. La **IL-6** es una citocina pleiotrópica que está implicada en la regulación de la respuesta inflamatoria. La producen, entre otros, los fibroblastos, las células endoteliales, los macrófagos y los linfocitos (Gabay, 2006). La señalización de la IL-6 juega un papel importante en el desencadenamiento de la inflamación, tanto crónica, como aguda. Su liberación es inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF α (Scheller et al., 2011).

La **IL-1** la producen los macrófagos, monocitos y células dendríticas en respuesta a la liberación del TNF α (Feldman et al., 2001). Existen 3 isoformas IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA. La IL-1 β está implicada en la patogénesis de diferentes enfermedades que cursan con inflamación como artritis reumatoide (Gattorno et al., 2008) o la enfermedad de Crohn (Kahle et al., 1992).

La **IL-12** es producida por los macrófagos, monocitos y otras células presentadoras de antígenos. Promueve la activación de la inmunidad celular activando las células T *helper* de tipo 1 (Th1) y estimula la producción y citotoxicidad de las células T citotóxicas y de las células Natural Killer (NK). Tiene un efecto sinérgico con el TNF α en la inducción de INF γ (Luckheeram et al., 2012).

La **IL-18** es una citocina proinflamatoria producida por monocitos y macrófagos e induce la activación de NKs y de linfocitos T (Dinarello et al., 2013). Además, estimula la producción del INF γ e incrementa el efecto de la IL-12.

El **INF γ** es otra citocina producida por linfocitos T activados y por NKs e interviene principalmente en la activación de macrófagos. Además, tiene una actividad antiviral, mediada por la respuesta de linfocitos Th1, por lo que se clasifica también como citocina proinflamatoria (Luckheeram et al., 2012).

La **IL-17** juega un papel importante en la inflamación, inmunidad y autoinmunidad y ha sido relacionada con enfermedades de carácter autoinmune, tales como artritis reumatoide o esclerosis múltiple (Lubberts et al., 2005, Gonzalez-García et al., 2009). Es un citocina proinflamatoria que actúa sobre varias dianas, como células epiteliales, endotelios, monocitos/macrófagos y linfocitos. Es producida principalmente por los Th17. Estimula la producción de otras citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , la IL6, el TNF α y también otras moléculas como prostaglandinas de macrófagos o células epiteliales que hacen que se mantenga los niveles de inflamación elevados (Chen y Zhou, 2015).

La **IL-22** tiene un papel sinérgico con la IL-17 y el TNF α . Como ya hemos dicho previamente, es producida principalmente por los Th22, aunque también la pueden producir los Th17 (Jia y Wu 2014). Las principales dianas de esta interleucina son las células epiteliales, los hepatocitos, células del páncreas y algunos tipos de fibroblastos. En estas células, la IL-22 fomenta la producción de péptidos antimicrobianos y la expresión de genes involucrados en la diferenciación y supervivencia celular, por lo que está implicada en la primera línea de defensa contra patógenos microbianos y la homeostasis epitelial (Wolk et al., 2006).

La **IL-21** es una citocina pleiotrópica producida principalmente por linfocitos T foliculares (Tfh). Tiene diversos efectos sobre varios tipos celulares, como CD4, CD8, linfocitos B, macrófagos, monocitos o células dendríticas. Dentro de los linfocitos T es producida, además, por los Th17. También induce su propia expresión y la de la IL-17 (Suto et al., 2008), además de inducir la diferenciación de los Th17 (Korn et al., 2007) e inhibir la diferenciación de las Treg (Attridge et al., 2012). Una de las funciones principales que lleva a cabo la IL-21 es la de la activación de los linfocitos B (Ozaki et al., 2004, Moens y Tangye, 2014), que se explica en más detalle en el apartado 3.3.3.2. Otras funciones biológicas de esta interleucina incluyen la contribución a la proliferación y actividad citotóxica de los CD8 (Liu et al., 2007), la maduración funcional de las NK (Brady et al., 2010) y la activación de los monocitos (Vallieres y Girard, 2013).

La **IL-23** es secretada por células dendríticas y macrófagos activados. Su función en la respuesta inmune es regular la proliferación de los Th17. Además induce a los CD8 citotóxicos de memoria a proliferar y producir interleucinas proinflamatorias. Se ha descrito esta citocina como fundamental en el control de la inflamación de tejido periférico.

La **IL-4** es una citocina antiinflamatoria responsable del control de la inflamación del cerebro. La IL-4 reduce la producción de COX-2 y de mediadores inflamatorios como TNF α e IL-1 β por microglía activa *in vivo* e *in vitro* (Furlan et al., 2000, Ledebøer et al., 2000). La IL-4 es producida por un tipo de linfocito T helper, los Th2, que a su vez también secretan otras interleucinas antiinflamatorias como la **IL-13**.

Otra interleucina antiinflamatoria es la **IL-10**. La producen principalmente los monocitos de tipo no clásico (antiinflamatorio) y también linfocitos B y T, principalmente T reguladoras. Es una citocina pleiotrópica con función reguladora en la inflamación. Por una parte, tiene un efecto positivo en la supervivencia de las células B, su proliferación y la producción de anticuerpos. Por otra parte, tiene un efecto negativo sobre la producción de citocinas de los CD4 y moléculas coestimuladoras de macrófagos. Sin embargo, algunas investigaciones han mostrado que la IL-10 inhibe el LPS y los productos bacterianos mediante la inducción de citocinas proinflamatorias como el TNF α (Opp et al., 1995), IL-1 β (Opp et al., 1995), IL-12 (Aste-Amezaga et al., 1998) y el IFN γ (Varma et al., 2001).

El **TGF β** pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento y es también una citocina mediadora de la respuesta inmune. Es una proteína multifuncional que controla la proliferación y diferenciación de muchos tipos celulares. Muchas células sintetizan TGF β y tienen receptores para ella. Puede promover tanto la diferenciación de los Th17 como de las T reguladoras en

función de la concentración a la que se encuentre. A altas concentraciones, favorece la supresión del factor de transcripción RORC a través de un aumento de FOXP3, y con ello suprime la expresión de la IL-17, favoreciendo, por tanto, el desarrollo de las T reguladoras. A bajas concentraciones, junto con IL-6 e IL-21, favorece la expresión de la IL-17 y el receptor de IL-23, promoviendo la diferenciación de las Th17 y la supresión de las T reguladoras (Zhou et al., 2008).

El **CCL20** (o MIP-3) es una citocina con una gran capacidad quimio-atrayente para linfocitos. Se induce por factores microbianos como el LPS o citocinas inflamatorias como el TNF α y el IFN γ , mientras que es inhibido por la IL-10. El CCL20 se expresa en varios tejidos y células como en linfocitos de la periferia, nódulos linfáticos, células endoteliales e hígado. Se une al receptor CCR6 y provoca una atracción química dependiente de gradiente a las células que expresen dicho receptor (como las Th17 y las Th22) para atraerlas a tejido inflamado. Se ha descrito que estas dos moléculas, CCL20 y CCR6, están implicadas en patologías hepáticas y carcinomas hepatocelulares (Affo et al., 2014). Sin embargo, el papel del CCL20 en el daño hepático crónico no se conoce.

El **CXCL13** es otra citocina implicada en procesos inflamatorios cuyo papel principal es la guía de linfocitos B hacia los centros germinales, formados por linfocitos B activados y linfocitos T efectores, principalmente Th foliculares, además de células dendríticas y macrófagos. Esta citocina es secretada por las células dendríticas foliculares y los Tfh. Además la IL-21 actúa como co-estimuladora de la producción del CXCL13. De esta manera, tras la secreción de CXCL13 desde los folículos linfoides, se produce un gradiente de esta citocina que atrae hacia los centros germinales a las células positivas para su receptor CXCR5, presente en linfocitos B y Tfh. (Pereira et al., 2010). Por lo tanto, niveles elevados en plasma de CXCL13 están relacionados con una mayor actividad en los centros germinales (Havenar-Daughton et al., 2016).

La **IL-15** es miembro de una familia de citocinas a la que también pertenece la IL-2, con la que está muy relacionada por tener una estructura similar. Se expresa de manera constitutiva en un gran número de tipos celulares como monocitos, macrófagos, células dendríticas, queratinocitos, fibroblastos y algunas células nerviosas. Se encarga de regular la homeostasis celular en la respuesta inmune innata y adaptativa (Lodolce et al., 2002, Todd et al., 2001).

La **CX3CL1**, también llamada fractalkina, es una quimocina sintetizada en las células endoteliales como proteína de membrana con un dominio N-terminal que se libera y se secreta. Su receptor específico, CX3CR1, se expresa en monocitos y linfocitos (como es el caso de los linfocitos CD4+CD28-). La fractalkina unida a membrana funciona como una molécula de

adhesión para las células que presentan su receptor y la parte secretada tiene una función de quimioatracción. Por lo tanto, la función principal de esta citocina es la regulación de la adhesión entre leucocitos y células endoteliales. La producción de la fractalkina se estimula con la presencia de TNF α , IL-1, LPS e INF γ (Imaizumi et al., 2004)

3.3.3. Citocina de interés y sus vías de actuación

3.3.3.1. Papel del STAT3 en linfocitos: vías de señalización de la IL-6, IL-17, IL-21 e IL-22

STAT3 (*Signal Transducers y Activators of Transcription 3*) es un factor de transcripción perteneciente a la familia de las STAT, un grupo de proteínas citoplásmicas que responden a citocinas y factores de crecimiento. (Mali, 2015). STAT3 es uno de los principales mediadores de las funciones desempeñadas por la IL-6.

Tanto la IL-6 como el STAT3 han sido propuestos recientemente como los principales reguladores de la diferenciación de las Th17, que a su vez, mediante la secreción de IL-17, activan de nuevo la expresión de la IL-6, formando un bucle de retroalimentación positiva (Camporeale y Poli, 2012).

Además de la IL-6, otras citocinas también desencadenan la fosforilación de STAT3, como la IL-21 (Wan et al., 2015) y la IL-22 (Sabat et al., 2014) que pueden desencadenar la activación de STAT3 en linfocitos T como factor de transcripción para regular genes implicados en procesos celulares incluyendo la proliferación, supervivencia, activación y diferenciación.

La IL-21 al unirse a su receptor, induce la expresión y producción de IL-17 mediante la ruta del STAT3. Además STAT3 puede unirse directamente al promotor de la IL-21 activando su producción (Wei et al., 2007). La IL-6 por sí misma también induce la producción de IL-21 (Suto et al., 2008) e induce la expresión del AHR (factor de transcripción de los TH22) mediante la vía de la activación del STAT3 (Stobbe-Maicherski et al., 2013), por lo que todas estas interleucinas están íntimamente relacionadas en los procesos inflamatorios.

Cuando las interleucinas se unen a su receptor, se desencadena la activación de la ruta de JAK/STAT que termina activando, por fosforilación, el factor de transcripción STAT3. La fosforilación del STAT3 hace que se traslade al núcleo y desencadene la expresión de un paquete de genes, entre los que se encuentra RORC (Camporeale y Poli, 2012), el BCL6 (Cui et al., 2011), y el AHR (Stobbe-Maicherski et al., 2013), factores de transcripción que desencadena la secreción de IL-17, IL-21 e IL-22 en linfocitos CD4 (Camporeale y Poli, 2012, Backert et al., 2014).

En el artículo de Yang et al., 2007 se observa cómo la sobreexpresión de STAT3 da como resultado un gran aumento de las células productoras de la IL-17 y se relaciona con un aumento de RORC. Y por el contrario, una depleción de STAT3 en linfocitos CD4 resulta en una dramática reducción del número de Th17.

En conclusión, la IL-17, la IL-6, la IL-21 y la IL-22 participan en un bucle de activación en el que STAT3 conduce a los linfocitos T *naive* a la diferenciación en linfocitos Th17, Tfh y Th22 que son productores de IL-21, IL-22 y de IL-17, que actúa como estimulador de la expresión y secreción de IL-6.

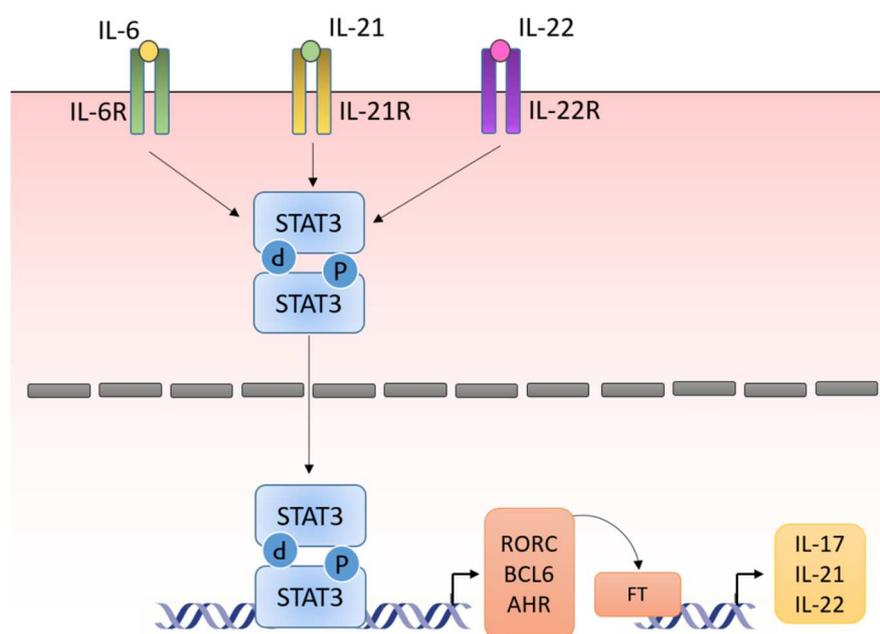


Figura. 3. Vía de señalización del STAT3 en linfocitos T. Esquema representativo de la producción de IL-17, IL-21 e IL-22 por la vía de fosforilación del STAT3 desencadenado por la unión de la IL-6, la IL-21 o la IL-22 a su receptor. FT: factor de transcripción.

3.3.3.2. Papel de diferentes citocina sobre los linfocitos B y los centros germinales

La respuesta de las células B está guiada por la integración de señales a partir del receptor de células B (BCR) y los recetores de citocina. La unión de la IL-21 a su receptor en la membrana del linfocito B desata la ruta de transcripción dependiente de STAT3 para la generación de células plasmáticas y producción de inmunoglobulinas. (Berglund et al., 2013).

La función principal de las células B es producir anticuerpos específicos de antígenos. Esta producción es llevada a cabo por dos poblaciones de células B efectoras: las células de memoria que circulan por sangre periférica y responden rápidamente cuando reconocen un

antígeno y las células plasmáticas de larga vida, que secretan constitutivamente grandes cantidades de anticuerpos específicos de alta afinidad. Ambas poblaciones son generadas a partir de las células B *naive* en los centros germinales de tejido linfoide secundario. Estos centros germinales se establecen cuando las células B encuentran un antígeno específico y reciben señales por parte de los linfocitos T foliculares para su crecimiento, supervivencia, selección y diferenciación.

La IL-21 es la citocina con más influencia sobre las células B humanas (Ozaki et al., 2004). Induce la secreción de IgM, IgG e IgA en las células B maduras. Cuando la IL-21 se une a su receptor activa una cascada de señalización, que provocan la fosforilación de STAT1, STAT3 y STAT5 desencadenando la ruta de transducción que acaba en la producción de las inmunoglobulinas (Berglund et al., 2013).

Los linfocitos B *naive*, se organizan en folículos primarios alrededor de las zonas de linfocitos T y son atraídos por quimiocinas, como el CXCL13, producido por células dendríticas foliculares (Pereira et al., 2010). El receptor para este ligando, CXCL13, es el CXCR5 que se encuentra presente en las células B y las Tfh y esta atracción es la responsable de promover la entrada de los linfocitos B en los folículos (Laurent et al., 2010).

Tras la activación de las Tfh, se produce un aumento en la expresión del receptor en membrana CXCR5 y ocurre una migración de los linfocitos foliculares hacia los folículos donde se hallan las células B (Laurent et al., 2010). Una vez allí, se produce la unión Tfh-linfocito B y se desencadena la respuesta estimuladora.

Una vez que los linfocitos B ya han sido activados pasan a organizarse en folículos linfoides secundarios, donde se encuentran los centros germinales que albergan a los linfocitos activados que van a producir anticuerpos de alta afinidad para un antígeno concreto (Thorbecke et al., 1994).

La expresión de CXCL13 es dependiente de otra citocina, la linfotóxina alpha 1 beta 2 (LT α 1 β 2), que la expresan en su membrana los linfocitos B una vez activados por la ruta de activación del CXCR5 al unirse al CXCL13. Las células dendríticas foliculares (CDF) expresan el receptor para la LT α 1 β 2 y tras esta unión se promueve la producción y secreción de la CXCL13 por parte de estas CDF (Pereira et al., 2010, Shen y Fillatreau, 2015). Por lo tanto, se produce un bucle de retroalimentación positiva entre estos tipos celulares y sus citocina.

Además, los linfocitos Th17 también expresan en su membrana la $LT\alpha 1\beta 2$, por lo que activarán también a las CDF para la producción de CXCL13 y sus interleucinas, la IL-17 y la IL-22 también son capaces de fomentar la formación de folículos linfoides actuando directamente sobre células estromales, como las CDF, productoras de CXCL13 (Grogan y Ouyang, 2012).

3.4. Relación entre el sistema periférico y el sistema nervioso central (SNC)

El cerebro tiene su propio sistema inmune que es activado tanto por factores del SNC, como del sistema de inmunidad periférica. Por ello, por ejemplo, la administración parenteral de agentes pirógenos (como LPS o IL-1 β), no solo causa una inflamación sistémica, sino también, una inflamación en el SNC (Simard y Rivest, 2005).

Existen varias hipótesis de cómo la inflamación periférica puede comunicarse con el cerebro e inducir una respuesta similar en su sistema inmunitario.

En los órganos circunventriculares se ha detectado la presencia de receptores de tipo Toll o TLR y receptores de interleucinas que se activan tras el reconocimiento de agentes patógenos o citocinas específicas (Laflamme y Rivest, 2001, Van Dam et al., 1998), por lo que se propone esta comunicación directa como una de las posibles vías de actuación de moléculas periféricas sobre el SNC (Figura 4A).

La señalización de citocinas es otro mecanismo que media la respuesta cerebral a los estímulos periféricos (Figura 4B). Las citocinas utilizan tanto vías neurales (Goehler et al., 1999) como humorales (Laflamme y Rivest, 2001) para comunicar el sistema periférico con el nervioso. Y además, pueden ser transportadas al SNC a través de la BHE (Banks, 2005). Una vez que atraviesan la barrera, activan la microglía (células inmunes residentes en el tejido nervioso), la cual induce y propaga la señal de las citocinas a través del SNC (Block et al., 2007).

Otro mecanismo propuesto es la infiltración de células sanguíneas en el cerebro a través del paso de la BHE (Figura 4C) (D'Mello et al., 2009, Fabene et al., 2008). Se cree que el reclutamiento de los leucocitos en cerebro se inicia a partir de proteínas quimioatrayentes que produce la microglia del cerebro tras su activación por la señalización de citocina (D'Mello et al., 2009).

A nivel de la BHE, los leucocitos circulantes se adhieren a las células endoteliales vía interacción entre moléculas de adhesión, como las selectinas y sus correspondientes ligandos

leucocitarios (D'Mello et al., 2009, Fabene et al., 2008). Tras la unión, viene un proceso de rodamiento y extravasación a través de la BHE donde provocarán una inflamación local. Esta inflamación provoca alteraciones en la neurotransmisión, tanto por la disgregación de la BHE, como por efectos directos de las citocina en las células del sistema nervioso (Fabene et al., 2008).

La BHE es una estructura importante implicada en la comunicación sangre-cerebro. Está compuesta por células endoteliales conectadas entre sí por uniones *tight junction* y pueden interactuar con los astrocitos del SNC. En condiciones fisiológicas, esta barrera proporciona protección al SNC regulando la entrada de sustancias del plasma. A parte de moléculas liposolubles, gases y agua que entran por difusión simple, existe transporte activo para ciertas moléculas como electrolitos, glucosa o aminoácidos. Moléculas grandes como proteínas no son capaces de atravesar la barrera. (Lu et al., 2009, Strbian et al., 2008).

Estudios en el efecto de la inflamación sistémica periférica sobre la BHE muestran que, dependiendo de la severidad en la inflamación inducida, existe un rango en la disgregación de la barrera desde una ausencia de daño en caso de inflamación leve hasta daños severos en la barrera que permitirían el paso de moléculas más grandes como iones o proteínas (Ivens et al., 2007, Seiffert et al., 2004) que pueden alterar la homeostasis del ambiente del SNC dando lugar a alteraciones patológicas en la actividad neuronal (Tomkins et al., 2007).

Otra evidencia de la relación de la inflamación periférica con el cerebro, nos la dan los experimentos con inhibidores de $TNF\alpha$. La neutralización de esta citocina mediante la administración de un anticuerpo anti- $TNF\alpha$ a nivel periférico, previene el deterioro cognitivo en modelos de diferentes patologías. (Sahin et al., 2015, Belarbi et al., 2012). Además, la infusión directa de $TNF\alpha$ en el ventrículo lateral de ratas, tiene un efecto parecido a la inflamación periférica a nivel neuronal (Riazi et al., 2010).

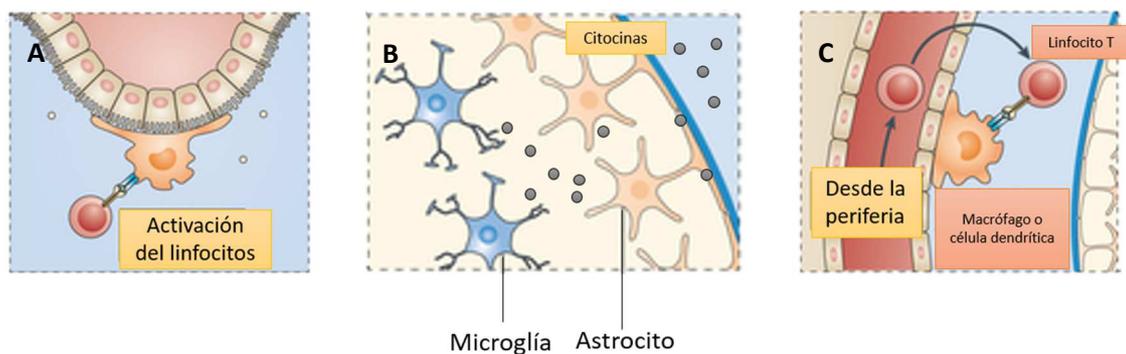


Figura 4. Relación entre el sistema periférico y el SNC. (Modificado de Dendrou et al., 2015). **A:** Activación de linfocitos a través de TLRs de órganos circunventriculares. **B:** Activación de la microglía del SNC a través de citocina de periferia. **C:** Infiltración de leucocitos de la periferia.

4. Alteraciones en el sistema inmunológico de pacientes cirróticos

4.1. Hígado cirrótico y alteraciones inmunológicas

Se sabe que en hígado cirrótico se producen una serie de alteraciones inmunológicas, tales como la disfunción fagocítica en neutrófilos, disminución de la actividad de las NK, expansión del TNF α por parte de los monocitos y un aumento de citocinas proinflamatorias (Lario et al., 2013, Girón-González et al., 2004).

Una vez que un agente tóxico, como el LPS, entra en la circulación portal, es reconocido por los hepatocitos y los macrófagos del hígado, las células de *Kupffer*. Si los niveles de endotoxina son elevados, estas células hepáticas van a liberar citocinas inflamatorias y quimio-atrayentes para reclutar neutrófilos y otras células mediadoras de la inflamación.

Cuando se produce el daño hepático, las células de Kupffer se activan y actúan como fuente de mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas proinflamatorias, como el TNF α , IL-1 β , IL-6 o IL-12, ion súper óxido, óxido nítrico, eicosanoides, quimiocinas y enzimas proteolíticas, produciendo un aumento de la citotoxicidad (Neuman et al., 2015).

Además, atraen a células del sistema periférico mediante quimiocinas como la familia del MIP (*macrophage inflammatory protein*) que van a conducir hacia el tejido inflamado células con función fagocítica, como neutrofilos, y otras que van a aumentar el ambiente proinflamatorio y citotóxico como monocitos y linfocitos, con el fin de controlar la infección o agente causante del daño hepático (Kolios et al., 2006).

Uno de los rasgos más comunes en los pacientes con cirrosis es la linfopenia, especialmente, de las células T *helper* y se suele atribuir al secuestro esplénico (Lario et al., 2013). Diversos estudios en humanos y modelos animales, documentan una reducción de células Th *naive* en enfermedades hepáticas de diversa etiología (Yonkers et al., 2011, Aseni et al., 1988 o en Aoki et al., 1993).

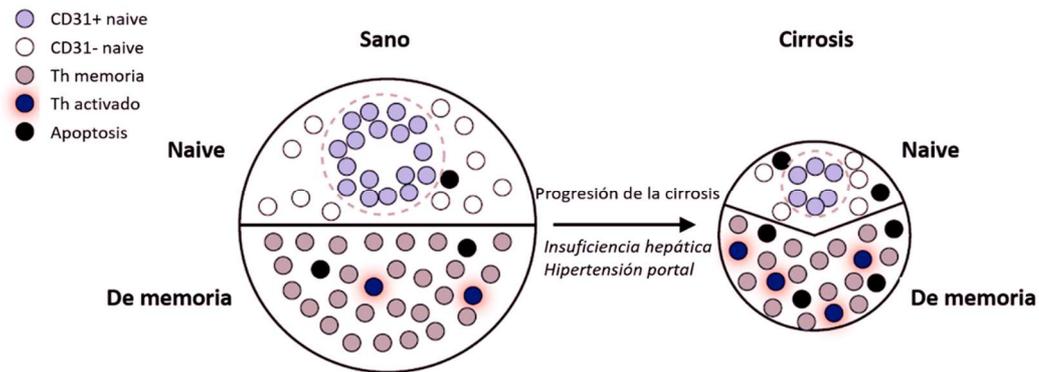


Figura 5. Linfopenia en pacientes cirróticos. Modificado de Lario et al., 2013.

En el artículo de la Figura 5 presentan varias causas que explicarían una deficiencia en la inmunidad de los pacientes con hígado cirrótico, centrándose exclusivamente en los linfocitos CD4. En primer lugar, un defecto en la timopoyesis provocaría una menor producción de linfocitos Th *naive*, referidos como linfocitos recién formados en el timo que conservan el marcador celular CD31. Por otra parte, el mayor secuestro esplénico provocaría la disminución de la población de linfocitos Th *naive* circulantes (en el esquema los refieren como CD31- *naive*) y por último, un aumento de la translocación bacteriana, muy común en pacientes cirróticos, provocaría una mayor activación en los linfocitos de memoria y un aumento en la muerte celular por apoptosis tanto en la reserva de células *naive*, como en las de memoria.

Además, la linfopenia es un desencadenante de la autoinmunidad debido a la expansión clonal de linfocitos T autoreactivos. En un ambiente linfopénico, el reconocimiento de lo propio induce que algunas células T se expandan mediante un mecanismo conocido como proliferación espontánea (Le Campion et al., 2009).

En los pacientes cirróticos también se detectan niveles alterados de interleucinas en suero, como consecuencia de la alteración de los distintos tipos celulares del sistema inmunitario. Se ha propuesto el estudio de estas citocinas como posible diana terapéutica en el tratamiento de los pacientes con enfermedad hepática (Hammerich y Tacke, 2014) y se ha estudiado el efecto que las citocinas tienen directamente sobre el hígado.

La IL-17, por ejemplo, promueve la fibrogénesis hepática a través de la activación de las células estrelladas hepáticas y facilita el desarrollo de cáncer de hígado a través del reclutamiento de células mieloides supresoras (Lan et al., 2009). Por otra parte, la IL-22 protege del desarrollo de fibrosis y esteatohepatitis (Yang et al., 2010) aunque participa en el desarrollo

del carcinoma hepatocelular (Jiang et al., 2011). La IL-10 es antiinflamatoria y tiene función protectora durante el daño hepático crónico y la fibrogénesis (Thompson et al., 1998). La IL-6 tiene un papel controvertido, ya que aunque tiene un papel crítico en la fase aguda de daño hepático (Yeh y Chen, 2010) pero la señalización de esta interleucina es protectora durante la progresión de la fibrosis (Streetz et al., 2003).

4.2. La enfermedad hepática y la autoinmunidad

Las enfermedades autoinmunes, incluyendo la diabetes tipo 1, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y el lupus, entre otras, afectan al 4% de la población occidental y se caracterizan por la generación de auto-anticuerpos contra antígenos propios (Thorsby y Lie, 2005). En muchos casos existe infiltración linfocitaria en órganos diana y destrucción de sus propias células. Estas enfermedades suelen ser crónicas y no tener un tratamiento adecuado.

La presentación de antígenos y la activación de las células T parece ser la clave en el desarrollo de la respuesta autoinmune (Simmonds et al., 2005). Esto ha promovido la investigación de las rutas implicadas en estos procesos, incluyendo como diana de estudios en las enfermedades autoinmunes, moléculas como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Este receptor es también conocido en humanos como antígeno leucocitario humano o HLA que a su vez puede ser dividido en varias subclases y regiones (Horton et al., 2004). A grandes rasgos, diferenciamos el MHC clase I que es reconocido por los linfocitos T CD8 y el MHC clase II que es reconocido por los linfocitos T CD4 (Choo, 2007).

Importantes estudios se han centrado en el papel del HLA clase II en la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4 ya que se han encontrado fuertes asociaciones con la mayoría de las enfermedades autoinmunes (Gough y Simmonds, 2007).

En ciertas enfermedades hepáticas también se ha detectado un componente autoinmune. Este es el caso de la hepatitis autoinmune o la cirrosis biliar primaria. Aunque estas enfermedades se consideren autoinmunes en naturaleza, la etiología y el efecto del ambiente todavía permanecen sin ser esclarecidos (Washington, 2007).

Las T reguladoras son imprescindibles para el mantenimiento de la tolerancia propia y la homeostasis celular. Se ha visto que los pacientes con cirrosis biliar primaria muestran una frecuencia reducida de CD4 T reguladoras (CD4+CD25+CD127-) circulantes (Rong et al., 2009) y además, que las CD8 T reguladoras (CD8+CD28-) tienen una capacidad reducida para evitar la

proliferación de las células efectoras en los pacientes con cirrosis biliar primaria en comparación con los controles sanos (Bernuzzi et al., 2010).

En hepatitis autoinmune también se ha detectado que las T reguladoras son inestables a la hora de regular la respuesta inmune debido, además de a la reducción del número celular y la disfuncionalidad, al aumento de la conversión de T reguladoras en efectoras (Grant et al., 2015).

En enfermedades hepáticas crónicas, especialmente en cirrosis descompensadas, se ha detectado, también, auto-anticuerpos y un aumento en los niveles de gammaglobulinas en suero (Wegener et al., 1986).

La hipergammaglobulinemia es un marcador histológico para formas de fibrosis avanzadas (Maruyama et al., 2007) y puede jugar un papel importante en la progresión de la enfermedad hepática (Watt et al., 2004). Se cree que la hipergammaglobulinemia es debida a la reducción de la eliminación de inmunoglobulinas por parte del hígado (Tanaka et al., 2007). Además, niveles elevados de IgG e IgM son importantes biomarcadores para la hepatitis autoinmune y la cirrosis biliar primaria, respectivamente (Czaja, 1996, Alvarez et al., 1999).

II. Objetivos

El objetivo de esta tesis es la caracterización de los cambios en la inflamación periférica asociados específicamente a la presencia de EHM en pacientes con cirrosis hepática.

Para alcanzar este objetivo analizamos los cambios en el inmunofenotipo y en el patrón de expresión de citocinas en pacientes cirróticos con o sin EHM, en comparación con controles sin daño hepático. Para ello, abordamos una serie de objetivos concretos:

1. Clasificar los pacientes del estudio según la presencia o ausencia de EHM.
2. Caracterizar las diferentes alteraciones neurológicas mediante test psicométricos que evalúan funciones cognitivas y motoras específicas en pacientes con EHM.
3. Caracterizar las alteraciones en el sistema inmunológico en pacientes sin y con EHM, analizando los siguientes parámetros:
 - Subpoblaciones de monocitos: clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) y no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺).
 - Poblaciones de linfocitos proinflamatorios CD4⁺CD28⁻ y de CD4 y CD8 *naive* y de memoria.
 - Activación de linfocitos T y B medida por el marcador de activación temprana CD69 y por los niveles de IgG.
 - Diferenciación de los linfocitos CD4⁺ a los diferentes subtipos efectores: Th1, Th2, Th17, Th22, iTreg o Tfh.
 - Niveles de citocinas en suero: IL-6, IL-10, TNF α , CCL20, CXCL13, IL-15, CX3CR1, TGF β , IL-21, IL-17, IL-12, IL-18, IL-1 β e IL-22.
4. Relacionar los cambios observados en la inflamación periférica con las alteraciones neurológicas asociadas a la aparición de la EHM.
5. Estudiar la capacidad de los parámetros alterados para diagnosticar la presencia de EHM.

III. Material y **Métodos**

1. Pacientes y controles

En el presente estudio se seleccionaron 187 pacientes con cirrosis hepática diagnosticada por biopsia hepática o por combinación de criterios clínicos, analíticos y radiológicos procedentes del servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia. En el estudio también participaron 98 sujetos sanos, como grupo control. Todos los individuos participaron en el estudio después de dar su consentimiento informado. El proyecto fue aprobado por los Comités Éticos del hospital, y se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki (1975).

Los criterios de exclusión aplicados para la selección de pacientes fueron:

- Deterioro cognitivo resultante de otra patología neuropsiquiátrica
- Consumo de alcohol en los últimos 6 meses
- Insuficiencia hepática avanzada (índice MELD > 25)
- Encefalopatía hepática clínica (escala de West-Haven ≥ 1)
- Hepatocarcinoma u otra patología con una supervivencia estimada menor a 3 meses
- Derivación porto-sistémica intrahepática transyugular o shunt porto-sistémico quirúrgico o peritonitis bacteriana espontánea

En el grupo de sujetos sanos se descartó cualquier enfermedad hepática.

En primer lugar, se revisó la historia clínica de los pacientes y, se analizaron y registraron las siguientes variables:

- Datos demográficos: edad, sexo y nivel de formación
- Etiología de la cirrosis (alcohol, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, etc.)
- Presencia de otras patologías (cáncer, diabetes, EPOC, insuficiencia renal, hipertensión arterial, etc.)
- Descompensaciones: presencia de varices esofágicas, episodios anteriores de encefalopatía hepática, presencia de ascitis, hipertensión portal.
- Parámetros séricos de laboratorio (enzimas indicadoras de la función hepática, bilirrubina, albúmina, hemograma, marcadores tumorales, etc.)
- Cálculo de los índices de función hepática Child-Pugh y MELD
- Tratamiento farmacológico del paciente
- Hábitos dietéticos (restricción proteica, etc.)

En segundo lugar, se citó a los pacientes y los controles para que acudieran en ayunas, se les tomó una muestra de sangre y realizaron, el mismo día, la batería de test psicométricos descrita más adelante.

1.1. Extracción de sangre

Las muestras de plasma se extrajeron en tubos BD Vacutainer de 5 mL con EDTA como agente anticoagulante. Dichas muestras se centrifugaron a 3000 x g, 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Se recogió el sobrenadante y se conservó a -80 °C en alícuotas de diversos volúmenes.

Las muestras de suero se extrajeron con tubos BD Vacutainer de 5 mL sin EDTA y se centrifugaron a 3000 x g, 10 minutos a TA. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -80 °C en alícuotas de diversos volúmenes.

Una muestra de sangre de unos 25 mL se tomó en tubos BD Vacutainer con EDTA y no se centrifugó, para la posterior obtención células mononucleares y medición instantánea del amonio (protocolos descritos más adelante).

Otra muestra de sangre se tomó en un tubo PAXgene® (*Blood RNA Tube*) de 2,5 mL para la extracción y estabilización de ARN intracelular a partir de sangre total para llevar a cabo un análisis de transcriptómica (protocolo descrito más adelante). Los tubos se conservaron en vertical de 2 a 72 horas a temperatura ambiente, después a -20 °C durante 24 horas para finalmente, conservarlos a -80 °C.

Además, obtuvimos un tubo de sangre de 2,5 mL con citrato, como agente anticoagulante, para el estudio de las poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo (protocolo descrito más adelante).

1.2. Realización de los test psicométricos

Los test psicométricos se realizaron el mismo día de la extracción de la sangre. Tras firmar un consentimiento informado, los controles y pacientes realizaron una serie de test, que se describen a continuación, para la clasificación de los pacientes con o sin encefalopatía hepática mínima y para el estudio de posibles alteraciones cognitivas y motoras.

2. Clasificación de pacientes con Encefalopatía Hepática Mínima

2.1. PHES

Para la clasificación de los pacientes se utilizó la batería de test psicométricos PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) considerada como “gold standard” para el diagnóstico de la EHM (Weissenborn et al., 2001; Ferenci et al., 2002). Esta batería está compuesta por cinco test psicométricos:

1. **Test de Dígitos y Símbolos (DST):** evalúa la velocidad de procesamiento y la memoria de trabajo. Consiste en una serie de números (1-9) cada uno de los cuales lleva asociado un símbolo diferente (Figura 6A). El sujeto debe escribir debajo de cada número, el símbolo que le corresponde, en un tiempo de 90 segundos. El test se puntúa con el número de aciertos realizados en dicho tiempo.

2. **Test de conexión numérica A (NCT-A):** evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. Consiste en un conjunto de números (1-25) colocados de forma desordenada y el sujeto tiene que unirlos en orden ascendente, de menor a mayor, trazando líneas sin levantar el rotulador del papel (Figura 6B). Se puntúa con el tiempo que se tarda en realizar la tarea.

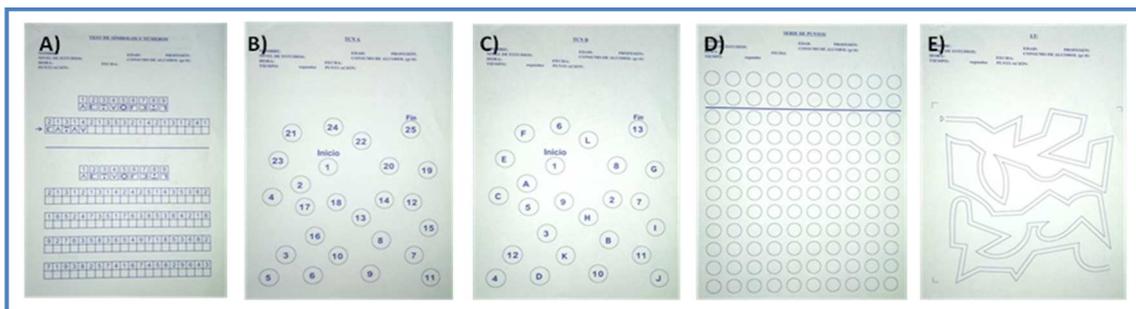


Figura 6. Batería de test psicométricos PHES. A: DST. B: NCT-A. C: NCT-B. D: SD. E: LTT

3. **Test de conexión numérica B (NCT-B):** evalúa la velocidad de procesamiento y la atención, añadiendo cierta dificultad al anterior. Consiste en un conjunto de números (1-13) y letras (A-L), colocados de forma desordenada donde el sujeto tiene que unir los números y las letras de forma alterna por orden ascendente (1-A-2-B-3...-L-13) trazando líneas entre ellos sin

levantar el rotulador del papel (Figura 6C). Se puntúa con el tiempo que se tarda en realizar la tarea.

4. **Test de puntos seriados (SD):** evalúa la coordinación visoespacial. Consiste en un conjunto de círculos donde el sujeto tiene que marcar con el rotulador un punto en el centro, lo más rápido y centrado posible (Figura 6D). Se puntúa con el tiempo que se tarda en realizar la tarea.

5. **Test de línea quebrada (LTT):** evalúa la coordinación visoespacial. Consiste en realizar un recorrido con un rotulador entre dos líneas con tramos rectos y curvos, donde el sujeto debe evitar tocarlas y salirse del recorrido (Figura 6E). Se puntúa con el tiempo que se tarda en realizar la tarea. Si el sujeto ha cometido fallos se puntúan sumando segundos, en función a la gravedad del fallos (tocar las líneas o salirse de ellas), al tiempo registrado al terminar el ejercicio.

Cálculo del PHES:

Para el cálculo numérico del PHES se utiliza una aplicación informática utilizando los valores de referencia obtenidos para la población española por la Red Española de Encefalopatía Hepática (Romero-Gómez et al., 2006). La aplicación se encuentra en la página web <http://www.redeh.org> . Se introducen los siguientes parámetros:

- Edad del sujeto
- Nivel de estudios (años estudiados)
- Puntuación de cada test: número de aciertos en el DST y tiempo de realización de la tarea, en segundos, en el resto de los test

Una vez introducidos estos datos, el programa, mediante un ajuste con la edad y el nivel de estudios, puntúa cada test con un valor numérico (número entero) positivo o negativo en función de si el sujeto ha realizado la tarea mejor o peor de lo esperado, respectivamente. La suma total de estas puntuaciones individuales nos da el valor global del PHES. Se considera un paciente con EHM cuando la puntuación global es menor o igual a -4.

3. Estudio de las alteraciones cognitivas

3.1. Test de Stroop de colores y palabras

El test de Stroop de Colores y Palabras (Stroop, 1935) es una prueba de flexibilidad cognitiva que evalúa el funcionamiento del sistema de atención. Este test ha sido utilizado para el estudio de múltiples patologías relacionadas con procesos cognitivos, como la dislexia, esquizofrenia y lesiones cerebrales (Golden CJ, *Stroop Color and Word Test*, Adaptación de TEA Ediciones, 2001).

Se ha utilizado este test en esta tesis porque existen estudios que indican que los pacientes con EHM muestran déficits de atención (Amodio et al., 2005, Felipo et al., 2012, Bajaj et al., 2013).

➤ Realización del test:

La prueba consta de tres partes (Figura 7) en las que se muestran diferentes estímulos:

- Tarea congruente: contiene una matriz de 10 filas de cinco palabras cada una con nombres de cuatro colores (azul, rojo, amarillo, verde) impresos en tinta de color negro (Figura 7A).
- Tarea neutra: contiene una matriz de 10 filas de cinco círculos impresos en diferentes colores (azul, rojo, amarillo, verde) (Figura 7B).
- Tarea incongruente: contiene una matriz de 10 filas de cinco palabras cada una con nombres de los cuatro colores utilizados en las anteriores, impresas en tinta de diferente color al correspondiente a la palabra escrita (Figura 7C).

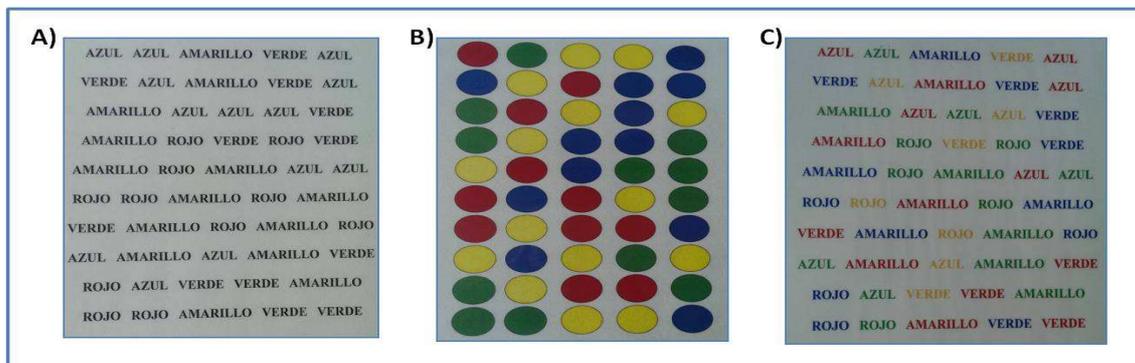


Figura 7. Test de Stroop. A: Tarea congruente. B: Tarea neutra. C: Tarea incongruente

El individuo dispone de 45 segundos para leer las palabras de la primera tarea, otros 45 segundos para nombrar los colores de la segunda y otros 45 segundos para nombrar el color de la tinta en la que están escritas las palabras de la tercera tarea. Deberá nombrar el máximo número de ítems en el tiempo establecido.

➤ Puntuación:

En este test obtenemos tres puntuaciones directas principales: número de palabras (P), número de colores (C) y número de palabras-colores (PC). Los errores no se tienen en cuenta pero producen una puntuación directa menor, ya que el sujeto es detenido para que repita el elemento. Una vez obtenidos los valores de P, C y PC, se corrigen según la edad del individuo si éste supera los 44 años (Golden, 2001):

Parámetro corregido	Adultos de 45-64 años	Adultos de 65-80 años
PALABRAS (P)	P + 8	P + 14
COLORES (C)	C + 4	C + 11
PAL-COL (PC)	PC + 5	PC + 15

A partir de estos parámetros corregidos (P, C, PC) se calcula un parámetro denominado “Interferencia”, que mide la capacidad del individuo para separar los estímulos de nombrar colores y palabras, suprimiendo la respuesta de lectura y concentrándose en la tarea de nombrar los colores. Para determinar la puntuación de la interferencia pura se calcula la diferencia entre PC y la PC estimada (PC’).

$$PC' = (C \times P) / (C + P)$$

$$\text{Interferencia} = PC - PC'$$

Una vez tenemos la puntuación directa (corregida) de P, C, PC y el valor de la “Interferencia”, la interpolamos en una tabla normalizada para la población española (Golden, 2001) con los valores correspondientes a la puntuación definitiva del test (puntuación T).

3.2. Test d2

El test d2 proporciona una medida concisa de la atención selectiva/sostenida y de la concentración mental, ya que evalúa la capacidad de atender selectivamente a ciertos aspectos relevantes de la tarea mientras se ignoran los irrelevantes de una forma rápida y precisa. Requiere una actividad de concentración en estímulos visuales.

En este test se reflejan tres componentes de la conducta atencional: velocidad o cantidad de trabajo realizado en un determinado tiempo; calidad de dicho trabajo (precisión) y relación entre velocidad y precisión (Brickenkamp R, *Test d2*, Adaptación de TEA Ediciones, 2009).

➤ Realización del test:

El test consiste en una hoja compuesta por 14 líneas con 47 caracteres cada una, las cuales contienen como estímulo visual las letras “d” y “p” acompañadas de una o dos pequeñas rayitas en la parte superior de cada letra, en la inferior, o en ambas. El individuo tiene 20 segundos por línea para revisar, de izquierda a derecha, el contenido y marcar sólo las “d” que contengan dos rayitas en total (las dos arriba, las dos debajo o una arriba y otra debajo), siendo éstos los estímulos correctos o *relevantes*. Las demás combinaciones (“p” con o sin rayitas y “d” con una, tres o cuatro rayitas) se consideran *irrelevantes* y no deben ser marcadas (Figura 8).

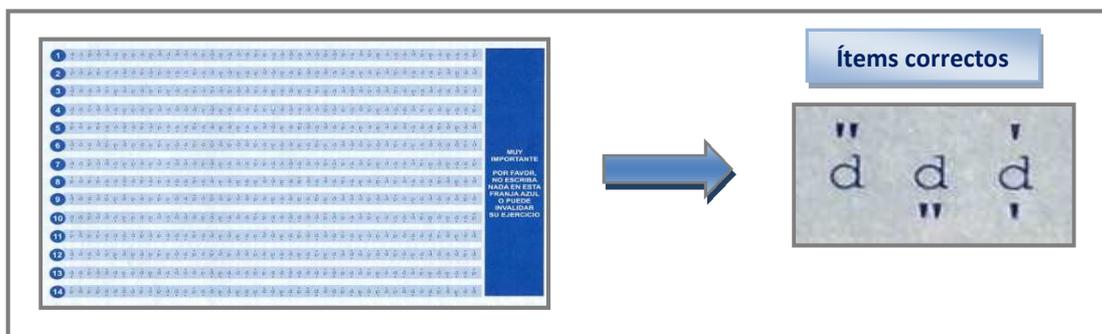


Figura 8. Test d2.

➤ Puntuación:

Las puntuaciones que podemos obtener de este test son múltiples:

- Total de respuestas (**TR**): es el número de casilla al que corresponde la última marca de cada línea. La suma de la TR de las 14 líneas nos proporciona una medida de la velocidad de procesamiento y cantidad de trabajo realizado.

3.4. Test de dígitos oral

Esta tarea es un subtest de la batería Wais (Wechsler Adults Intelligence Scale) y, está compuesta por dos subtest:

- **Dígitos directo:** Mide la atención selectiva. La prueba consiste en bloques de dos series de números, empezando primero por series cortas que se van alargando conforme pasamos de bloque (Figura 9B). La tarea se realiza leyéndole al sujeto los números de la serie y los tiene que repetir a continuación en el mismo orden. Cuando el sujeto acierta la serie se le puntúa con un “1”, y cuando la falla con un “0”, de manera que la prueba acaba cuando la puntuación de todas las series del mismo bloque es igual a “0”. La puntuación del test es la suma de series que se ha acertado.
- **Dígitos inverso:** Mide la memoria de trabajo y activa la zona frontal del cerebro. La prueba es similar a la de “Dígitos Directo”, pero en este caso el sujeto tiene que memorizar la serie de números que se le lee y repetirlos ordenadamente de manera inversa (Figura 9C). Se corrige de la misma manera que la anterior.

Obtenemos una puntuación global del test de Dígitos sumando las dos puntuaciones.

3.5. Test de letras y números oral

Este test mide la memoria de trabajo, teniendo más carga de memoria de trabajo que el de Dígitos, ya que es más complicado. Se basa en bloques de tres series que contienen letras y números mezclados, que van aumentando el número de elementos conforme avanza la prueba. Leemos al sujeto la serie y este debe decir en voz alta los elementos de manera que ordene primero todos los números de forma ascendente y después todas las letras alfabéticamente. (Figura 9D). La corrección se realiza igual que en los test de dígitos orales y la prueba no acaba hasta que no se fallen las tres series de un mismo bloque.

4. Estudio de alteraciones en la coordinación motora

Para el estudio de alteraciones en la coordinación motora, se escogieron dos test de fácil realización y corta duración.

4.1. Test de coordinación bimanual

Este test consiste en un tablero perforado con dos matrices de 4 filas con 10 agujeros cada una (Figura 10A). La prueba consiste en pasar unas clavijas metálicas de una matriz a la otra del tablero. Las clavijas se han de pasar con ambas manos simultánea y simétricamente, por filas, de fuera hacia dentro. Esta tarea se realiza 2 veces en cada dirección y se puntúa con el tiempo que se tarda en pasar las clavijas de una matriz a otra. Se suman las centésimas de minuto de los cuatro intentos y mediante una tabla estandarizada para el test se le da un valor de percentil al tiempo de realización, según el sexo del individuo, puesto que la tipificación del test mostró que las mujeres necesitan más tiempo para realizar la tarea.

4.2. Test de coordinación visomotora

Este test consiste en un tablero con una matriz de 6 filas y 6 columnas de perforaciones rectangulares, con diferente orientación, en las cuales se tienen que encajar unas piezas metálicas utilizando solo la mano dominante. (Figura 10B). Se realiza por filas, de izquierda a derecha y todas las piezas caben en cualquier agujero, siempre que se coloquen en la orientación correcta. La prueba se realiza dos veces y se puntúa según el tiempo que se tarda en colocar todas las piezas. Se suma el tiempo en centésimas de minuto de los dos intentos y mediante una tabla estandarizada para el test se le da un valor de percentil al tiempo de realización, según el sexo del individuo, por el mismo motivo que el test anterior.

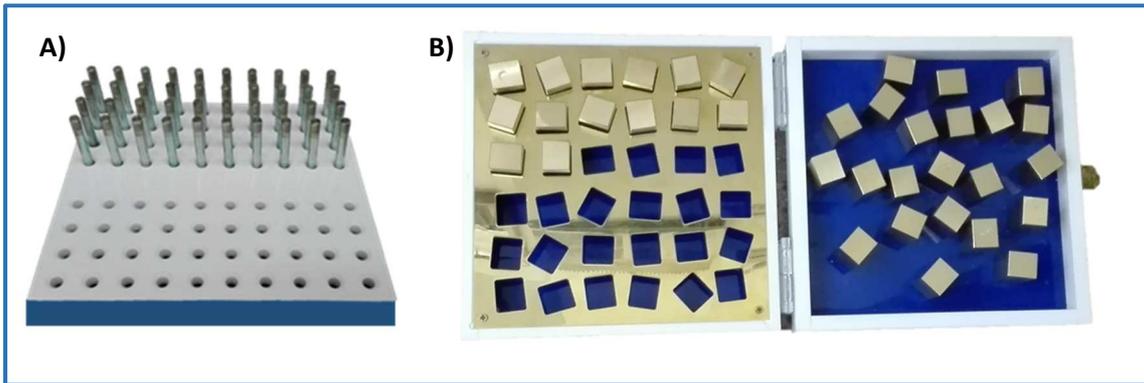


Figura 10. Test de coordinación motora. A: Bimanual. B: Visomotora.

5. Determinación de amonio en sangre

La medición del amonio en sangre se realizó con el aparato *Ammonia Checker II* (o PocketChem BA; Arkray Factory, Inc) que utiliza como reactivo un kit (Ammonia Test Kit II; Arkray Factory, Inc) que mide los niveles de amonio en la sangre basándose en el método de la micro-difusión. Este método tiene como ventaja respecto a otros, una medición simple, rápida y exacta, requiriendo un volumen pequeño de muestra. La rapidez de este ensayo es muy importante ya que la concentración de amonio en la muestra aumenta conforme aumenta el tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre.

El kit de reactivo consiste en unas tiras que contienen una capa receptora de muestra compuesta de ácido bórico (42,6 mg) e hidróxido sódico (18,7 mg) y una capa indicadora compuesta de verde de bromocresol (4,0 mg).

Cuando se aplica la muestra a la capa receptora de la tira, el agente amortiguador de pH impregnado (tampón borato) se disuelve volviendo alcalina la muestra. Los iones amonio (NH_4^+) de la muestra pasan, por el pH alcalino, a amonio gas (NH_3) que pasa a través de los poros del distanciador al indicador (verde de bromocresol), produciendo color. El grado de coloración es proporcional a la concentración de amonio gas producido, por lo que el aparato determina cuantitativamente el nivel de amonio en la muestra midiendo el color de la tira.

Para llevar a cabo la medición, aplicamos 20 μl de sangre total recién extraída en el centro de la capa receptora de la tira. Después de 180 segundos, quitamos el distanciador de la tira y la colocamos en la unidad óptica del dispositivo de medida, con la mancha de color de la capa

indicadora mirando hacia abajo. El nivel de amonio aparece en la pantalla en $\mu\text{mol/L}$. El rango de detección de éste método es de 7-286 $\mu\text{mol/L}$. Los niveles esperados en adultos sanos son menores de 54 $\mu\text{mol/L}$.

6. Aislamiento de células mononucleares (PBMC)

Las células mononucleares de sangre periférica, del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) son, en conjunto, monocitos y linfocitos. Reciben este nombre por poseer un único núcleo redondeado.

Las células mononucleares se aíslan por centrifugación en un gradiente de densidad con el reactivo Lymphoprep™ (Palex Mediacal SA). De esta manera, los eritrocitos y el resto de la fracción celular de la sangre quedarán en el fondo del tubo, separados del halo de PBMC por el Lymphoprep™. El plasma quedará en la parte superior (Figura 11).

Para el aislamiento de las PBMC, mezclamos la sangre recogida en tubos con EDTA (unos 25 mL). Con este volumen de partida, llevamos a cabo una serie de centrifugaciones y lavados que se detallan a continuación.

En primer lugar, diluimos la sangre en NaCl 0.9% en una proporción 1:1 para después verter con cuidado la sangre sobre el Lymphoprep en tubos corning de 15 mL con 1 volumen de Lymphoprep por cada 2 volúmenes de sangre. Centrifugamos a 800 x g, 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en una centrifuga de rotor basculante y con un programa de centrifugación sin freno. Recogemos la fase blanquecina (el halo de PBMC) junto con el plasma y lo pasamos a un tubo corning de 50 mL y llenamos hasta el doble de volumen con RPMI 1640 (Biowest) para lavar el exceso de Lymphoprep que pudiese quedar. Centrifugamos a 1000 x g, 10 minutos a TA. Resuspendemos el pellet en 6 mL de RPMI 1640 (Biowest) pasándolo a un tubo corning de 15 mL. Centrifugamos a 1000 x g, 10 minutos a TA.

En caso de que el pellet que obtengamos esté rojo, lo que significa que contiene eritrocitos, añadimos un paso extra de lisado: resuspendemos el pellet en 1 mL de Ortho-immune Lysing Reagent® (Ortho Diagnostic Systems, Raritan, USA), dejemos actuar 30-60 segundos y centrifugar a 250 x g, 5 minutos a TA.

Por último, resuspendemos el pellet en 3 mL de RPMI y separamos 10 μ L para contar el número de células con la cámara Neubauer (Marienfeld-Superior). Hacemos una dilución de la muestra con azul de tripán (Tripan Blue Solution, 0.4%, Sigma) en proporción 1:1. Cargamos 10 μ L de la dilución en la cámara Neubauer y contamos al microscopio el número de células vivas. (Sacamos el promedio de células vivas que hay en los 16 cuadrantes de la cámara y este valor lo multiplicamos por el factor de dilución con el azul de tripán (en nuestro caso el valor es 2) y por la constante 10.000 para obtener el número de células por mililitro (cél/s/mL)).

Una vez que sabemos el número de células vivas de la muestra, volvemos a centrifugar (1000 x g, 5 minutos a TA) para resuspender el pellet en suero bovino fetal inactivado teniendo en cuenta el volumen necesario para poner una cantidad de 5 millones de células por mililitro en cada criotubo y añadimos DMSO (10% del volumen final) para criopreservar las células.

Congelamos los criotubos de manera progresiva para mantener en todo momento su máxima integridad. Primero los congelamos dentro del Mr.Frosty (Nalgene™), previamente lleno con isopropanol, a -80 °C para asegurarnos su congelación progresiva de -1 grado por minuto. Y una vez pasadas al menos 24h, ya podemos almacenarlos en el congelador de -80 °C.

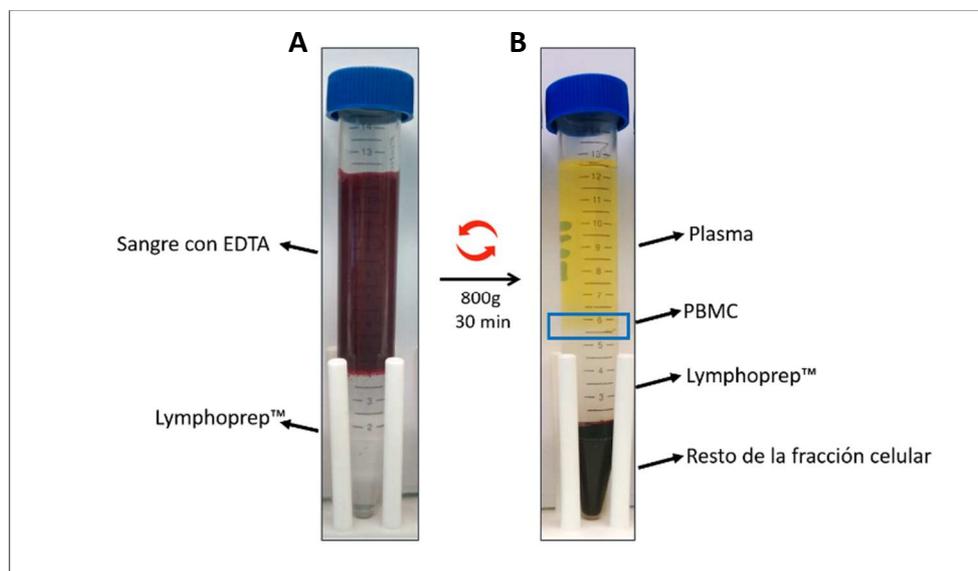


Figura 11. PBMC. Separación de células mononucleares antes (A) y después (B) de la centrifugación.

7. Medida relativa de proteínas a partir de las PBMC aisladas de la sangre mediante la técnica de *western blot*

Una vez aisladas y conservadas a -80 °C las muestras de PBMC, las descongelamos y procesamos para extraer la proteína total.

La descongelación debe ser lo más rápida posible para evitar que el DMSO dañe las células. Lavamos la muestra con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCL 2,68 mM, Na₂HPO₄ 6,4 mM, KH₂PO₄ anhidro 1,47 mM pH 7,4) para eliminar los restos. Centrifugamos (500 x g, 5 minutos, TA) y resuspendemos el pellet en tampón de lisis (HEPES pH 7,4 20nM, NaCl 100nM, Triton X100 1%, NaF 50nM, β-glicerofosfato 10nm, PMSF 1mM, ortovanadato 1mM, Pic 2 μL/mL). Incubamos durante 15-30 minutos en hielo y volemos a centrifugar (13000 x g, 10 minutos, 4 °C). Recogemos el sobrenadante, lo sonicamos durante 3 pulsos de 10 segundos y a continuación, determinamos la concentración de proteína con el método colorimétrico BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Este método consiste en la adición de dos reactivos (Reactivo A: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconíico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1 M. Reactivo B: sulfato cúprico 4%) a la muestra diluida que nos va a dar una reacción colorimétrica cuya absorbancia puede ser registrada por un lector de placas. El valor obtenido en dicho registro se extrapola en la curva patrón a partir de los valores obtenidos por concentraciones conocidas de BSA (Albúmina de suero bovino, del inglés *Bovine serum albumin*).

Tras la extracción y cuantificación de la proteína total de la muestra, realizamos la técnica de *western blot* para la inmunodetección de proteínas concretas.

Separamos las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida del (10-12%) con SDS (dodecilsulfato sódico). Cargamos la misma cantidad de proteína en cada pocillo disuelta en tampón de carga 2X (Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8, glicerol 5%, SDS 10%, 2-mercaptoetanol 2,5%, bromofenol 1%).

Los geles de poliacrilamida constan de dos zonas de diferente concentración de acrilamida: gel "*stacking*" (Tris base 0,125 M, 0,1% SDS a pH 6,8, acrilamida 3,9%, bisacrilamida 0,015%, APS 0,04% y TEMED), que concentra la muestra en una banda estrecha antes del inicio de su separación y gel "*running*" (Tris base 0,4 M, 0,1% SDS, pH a 8,8, acrilamida 8%, bisacrilamida 0,2%, APS 0,04% y TEMED), en el que las proteínas se separan según su masa

molecular relativa. El tampón empleado para la electroforesis contiene Tris base 0,3%, 0,02% SDS, glicina 1,5%. La intensidad de la corriente fue de 25 mA por gel.

Una vez terminada la electroforesis transferimos las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (Tris base 0,025 M, glicina 0,05 M) y a una corriente de 400 mA durante 2 horas. A continuación, bloqueamos las membranas con BSA al 5% en TBS-Tween 1X (NaCl 0,15 M, Tris Base 50 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,5) durante 1 hora a temperatura ambiente y lavamos varias veces con TBS-Tween 1X antes de incubar la membrana con el anticuerpo primario, diluido en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C.

Volvemos a lavar la membrana y la incubamos con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima fosfatasa durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

Finalmente, lavamos de nuevo con TBS-Tween 1X y damos un último lavado con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH 9,5). Revelamos la membrana utilizando un método colorimétrico para la enzima fosfatasa con una solución de revelado (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM, 0,6% stock NBT (Nitroblue-tetrazolium), 0,35% stock BCIP (5-Br-4-Cl-3-indolilfosfato), pH 9,5).

La reacción colorimétrica nos da un precipitado de color morado en forma de bandas en función de la cantidad de proteína presente en la membrana.

Las imágenes fueron capturadas en un escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C y la intensidad de las bandas cuantificadas con el programa AlphaImager 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK).

Utilizamos la actina como control de carga para hacer relativas a este control endógeno, la cantidad de las proteínas de interés encontradas en la muestra. Los datos se expresan en porcentajes referentes a la población control.

Tabla 5. Tabla de los anticuerpos utilizados:

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN 1º	ESPECIE	CASA COMERCIAL	ANTICUERPO SECUNDARIO*	DILUCIÓN 2º
STAT3	1:1000	Conejo (rbb)	Cell Signaling (ref. 9132)	α-rbb fosfatasa alcalina	1:4000
PSTAT3	1:2000	Conejo (rbb)	Cell Signaling (ref. 9145)	α-rbb fosfatasa alcalina	1:4000
MMP9	1:2000	Conejo (rbb)	Millipore (ref. AB19016)	α-rbb fosfatasa alcalina	1:4000
IL-21	1:500	Conejo (rbb)	Abcam (ref. ab5978)	α-rbb fosfatasa alcalina	1:4000
B-ACTINA	1:4000	Ratón (ms)	Abcam (ref. ab6276)	α-ms fosfatasa alcalina	1:4000

*Todos los secundarios son de la casa comercial Sigma

8. Medida de la expresión génica a partir de PBMC aisladas de la sangre

8.1. Aislamiento de ARN total

En primer lugar, para el aislamiento del ARN total de las PBMC utilizamos el kit de extracción *RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare) siguiendo el protocolo de purificación de ARN total a partir de células aisladas. El protocolo consiste en una serie de purificaciones en columna seguida de una digestión del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico mediante una enzima desoxirribonucleasa (DNasa).

A continuación, determinamos la concentración y pureza del ARN mediante el uso del Nanodrop ND-2000 (Nanodrop, LabTech International). Comprobamos la pureza del ARN atendiendo al ratio de absorbancia $\lambda=260 \text{ nm}/\lambda=280 \text{ nm}$, de manera que valores comprendidos entre 1,8 y 2,0 nos indican un ARN en buen estado.

8.2. Retro-transcripción del ARN

La reacción de retrotranscripción se lleva a cabo mediante una RT-PCR. Se hizo en un único paso en el que el ARN total se retrotranscribe a ADN complementario con el kit *High-Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Applied Biosystems). Para ello utilizamos un termociclador T-100 (Biorad).

Las condiciones de PCR se detallan a continuación: 10 minutos a 25 °C, 60 minutos a 37 °C (x2) 5 minutos a 85 °C, 30 segundos a 4 °C y se mantiene a 10 °C finales. El volumen final de la reacción es de 20 µl y la concentración inicial de ARN puede variar en función de las necesidades manteniendo siempre la misma cantidad de ADN complementario para la PCR cuantitativa.

8.3. PCR cuantitativa (qPCR)

Las reacciones de qPCR se realizan por duplicado en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems). Cuantificamos la expresión de cada gen de interés relativa a la expresión de un control endógeno de expresión constitutiva, en este caso utilizamos el HPRT.

En todos los casos utilizamos sondas taqman[®] (Applied Biosystems) conjugadas con el fluoróforo FAM (ver Tabla 6) y el *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems).

La reacción de qPCR se lleva a cabo en un termociclador ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems) con el software StepOne 2.1 con las siguientes condiciones de amplificación: 40 ciclos de 10 minutos a 95 °C, 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

El incremento (*fold change*) de la expresión del gen se calcula en las muestras los pacientes (sin y con EHM) respecto a los controles mediante el método de $\Delta\Delta CT$ donde $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (muestra) – ΔCT (control = media de los valores CT de todas las muestras controles), y el segundo ΔCT es el CT del gen constitutivo HPRT menos el CT del gen de interés (Tabla 6).

Tabla 6. Sondas utilizadas para medir los niveles de expresión de los genes de interés.

GEN DE INTERÉS	REFERENCIA SONDAS TAQMAN®
HPRT	Hs02800695_m1
AHR	Hs00907314_m1
RORC	Hs01076122_m1
BCL6	Hs00153368_m1
FOXP3	Hs01085834_m1
TBX21	Hs00203436_m1
GATA3	Hs00231122_m1

9. Estudio de activación de linfocitos *in vitro* a partir de las PBMC

Partimos de nuevo de las PBMC aisladas de sangre total y conservadas a -80 °C para cultivar los linfocitos CD4 y activarlos para su posterior estudio.

En primer lugar, la descongelación debe ser rápida como ya mencionamos anteriormente en el apartado 7. Una vez descongelado el vial en baño de 37 °C, se lava con medio RPMI 1640 (Biowest) y se centrifuga (500 x g, 10 min, TA) para obtener el pellet del que partiremos siguiendo el protocolo del kit comercial de aislamiento de CD4 (CD4 T Cells Isolation Kit Human, Miltenyi Biotec). Este protocolo consiste en una serie de lavados con un buffer (PBS 1X, pH 7.2, 0.5% FBS (Suero Bobino Fetal, del inglés *Fetal Bovine Serum*) y 2mM EDTA y la incubación en frío de las mezclas de anticuerpos:

1. Mezcla de anticuerpos biotinilados monoclonales anti proteínas humanas contra CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , y CD235a (*Glycophorin A*).
2. Mezcla con microesferas conjugadas con anticuerpos monoclonales anti biotina (isotipo IgG1 de ratón) y anti anticuerpo CD61 (isotipo IgG1 de ratón).

Una vez que las células han sido incubadas con estos anticuerpos, se pasan por unas columnas de filtrado (LS MACS columns, Miltenyi Biotec) imantadas a un soporte magnético (Separator MidiMACS, Miltenyi Biotec). Las células CD4+ son recogidas tras el paso de la muestra por la columna por depleción de células no marcadas con anticuerpos magnéticos (selección negativa).

Tras aislar las células CD4+, las contamos en la cámara Neubauer y las resuspendemos en medio RPMI con 10% FBS + 1% penicilina-estreptomina (a 1 millón de células por mililitro) junto con anticuerpo anti-CD28 (Becton Dickinson) (0,5 µg/mL) y las sembramos en placas de 48 pocillos previamente incubadas con un anticuerpo anti-CD3 (Becton Dickinson) (0,5 µg/mL en PBS toda la noche a 4 °C), a 0,5 millones de células por pocillo.

Para el control de activación de este experimento también sembramos un pocillo con células CD4+ aisladas sin el anticuerpo CD28 en el medio.

Tras 6h de activación en el incubador (37 °C, 5% CO₂), se recoge el medio de cultivo de las células, donde podremos medir todas las citocinas que hayan sido secretadas. Por otra parte recogemos el pellet celular de linfocitos CD4 activados y sus controles no activados. Se guardan todas las muestras en el congelador a -80 °C (Figura 12).

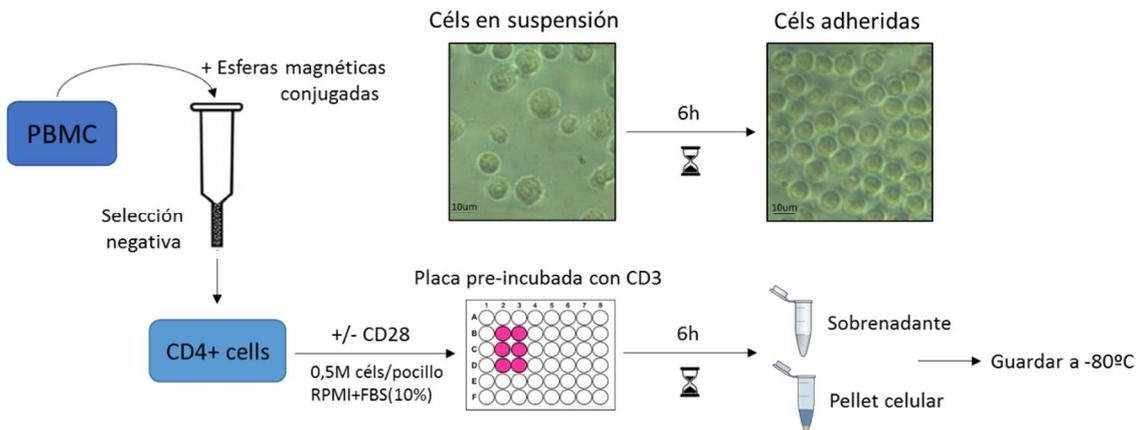


Figura 12. Modelo experimental del aislamiento y activación de linfocitos CD4+. Céls, células.

Una vez guardada la muestra, utilizamos el sobrenadante del cultivo celular para medir, por ELISAS (explicadas en el siguiente apartado), las interleucinas IL-17, la IL-22 y el TNF- α y utilizamos el pellet celular para medir la IL-21.

10. Determinación de parámetros bioquímicos en suero, plasma y medio de cultivo

El suero y plasma de la sangre de pacientes se obtuvo y procesó como se ha explicado en el apartado 1.1. Una vez guardado a -80 °C descongelamos la alícuota necesaria para medir el parámetro de interés. En el caso del medio de cultivo de los linfocitos activados, procedemos de la misma manera teniendo en cuenta la dilución necesaria para cada citocina y utilizando como blanco, en caso de necesitarlo, el medio de cultivo sin células.

10.1. Medida de citocinas en suero o medio de cultivo

Todas las citocinas, en su mayoría interleucinas fueron medidas en suero por ELISA en kits comerciales siguiendo el protocolo correspondiente a cada uno de ellos (Tabla 7).

A continuación se detalla el protocolo general de cuantificación colorimétrica por ELISA, teniendo en cuenta que cada kit comercial puede tener sus variaciones en el mismo.

Se emplea una placa de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal contra la citocina humana de interés para que se una la que esté presente en la muestra de suero, plasma o medio. Se hace una curva de calibrado acorde al rango de detección del kit comercial, utilizando el estándar proporcionado y haciendo las diluciones recomendadas. Se añade el volumen necesario de los estándares y de las muestras a los pocillos y se incuba durante el tiempo requerido. La citocina presente en el suero se unirá al anticuerpo, a su vez unido a la placa. Se lava varias veces con solución de lavado específica del kit comercial y se aspira los pocillos para eliminar todo aquello que no se haya unido. Se añade el anticuerpo de detección biotinilado. Se incuba durante el tiempo especificado por el protocolo y se formará un complejo anticuerpo-antígeno (anticuerpo biotinilado). Se vuelve a lavar la placa, se añade estreptavidina conjugada con peroxidasa y se incuba de nuevo el tiempo necesario. Se lavan los pocillos con solución de lavado y se añade el sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine) que produce un compuesto con una intensidad de color proporcional a la cantidad de citocina de interés presente en la muestra. Tras la reacción colorimétrica, se añade la solución de Stop que suele ser un ácido para parar la reacción y se lee la absorbancia a 450 nm en el lector de placas (Multiskan Ascent).

En algunos casos, en vez del complejo biotina-estreptoavidina-peroxidasa, se utilizan anticuerpos conjugados que se revelan con otra sustancia colorimétrica proporcionada por el kit.

Los resultados se calculan extrapolando la absorbancia obtenida en las muestras en la curva patrón de los estándares que nos indica la concentración de citocina presente (pg/μl), en función de la absorbancia leída.

Tabla 7. Kits comerciales ELISA

CITOCINAS	KIT COMERCIAL
IL-6	Human IL-6 Platimun ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS213/2
IL-18	Human IL-18 Platimun ELISA eBioscience ref. BMS267/2CE
IL-10	Human IL-10 Quantikine ELISA R&D systems ref. D1000B
INF γ	Human IFN- γ Quantikine ELISA R&D systems ref. DIF50
IL-12	Human IL-12 Quantikine ELISA R&D systems ref. D1200
IL-17	Human IL-17 High Sensitivity ELISA eBioscience ref. BMS2017HS
IL-23	Human IL-23 Platimun ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS2023/3
IL-21	Human IL-21 Platimun ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS2043
IL-13	Human IL-13 Platimun ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS231/3
CCL20	Human CCL20/MIP-3 α Quantikine ELISA R&D systems ref. DM3A00
IL-4	Human IL-4 High Sensitivity ELISA eBioscience ref. BMS225HS
TGF β	Human TGF- β 1 Platimun ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS249/4
TNF α	Human TNF- α Quantikine High Sensitivity ELISA R&D systems ref. HSTA00D
IL-22	Human IL-22 Platinum ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS2047
CXCL13	Human CXCL13/BLC/BCA-1 Quantikine ELISA Kit R&D systems ref. DCX130
IL-15	Human IL-15 Quantikine ELISA Kit R&D systems ref. D1500
CX3CL1	Human CX3CL1/Fractalkine Quantikine ELISA Kit R&D systems ref. DCX310
IL-1 β	Human IL-1beta Platinum ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS224/2

Human CX3CL1/Fractalkine Quantikine ELISA Kit R&D systems ref. DCX310

10.2. Determinación de LPS en suero

Para determinar los niveles de LPS (lipopolisacáridos) en suero usamos un kit comercial de detección de endotoxina bacteriana (*Limulus amoebocyte lysate (LAL) chromogenic endpoint assay*, Hycult biotech. HIT302).

El suero, plasma y otros fluidos biológicos pueden contener componentes inhibidores de la endotoxina, por lo que calentamos la muestra, previamente diluida un tercio, a 75°C durante 5 minutos para neutralizarlos. Además de esto, utilizamos muestras con agua libre de endotoxina en vez del reactivo de LAL como control negativo.

El procedimiento fue como el de una ELISA, en una placa de 96 pocillos, ponemos una curva estándar de concentración conocida, y las muestras y sus controles con y sin el reactivo, respectivamente. Se deja incubar durante 30 minutos a TA y después se lee la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Multiskan Ascent).

A partir de la curva patrón, calculamos, extrapolando los valores las concentraciones de nuestras muestras.

10.3. Medida de proteínas en plasma

10.3.1. Medida de Inmunoglobulina G (IgG) en plasma

A partir del plasma extraído de la sangre total, cuantificamos la concentración de proteínas por el método BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Calculamos el volumen necesario para obtener la misma cantidad de proteína en cada muestra.

Cargamos la cantidad deseada en un gel de poliacrilamida al 12% para llevar a cabo la inmunodetección de la IgG por *western blot* (ver apartado 7). Utilizamos el anticuerpo anti IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina, monoclonal de ratón, (Sigma ref. A2064) a una dilución de 1:4000.

10.3.2. Medida de la metalopeptidasa MMP9 en plasma

A partir del plasma extraído de la sangre total, cuantificamos las muestras de la misma manera que en el apartado anterior y procedemos directamente a la inmunodetección mediante la técnica de *western blot* explicada previamente (apartado 7).

En este caso utilizamos el anticuerpo anti la proteína MMP9 (ver referencia y dilución en la Tabla 5).

11. Estudio de transcriptómica a partir de sangre total

Para la realización de este estudio utilizamos el sistema *PAXgene Blood RNA* (producido por QIAGEN GmbH para PreAnalytiX), que consiste en los tubos de recogida de sangre (*PAXgene Blood RNA Tubes*) y el kit para purificación de ácidos nucleicos (*PAXgene Blood RNA Kit*). El sistema proporciona la recogida, almacenamiento y transporte de sangre así como la estabilización del ARN intracelular a partir de sangre total para su posterior análisis.

Seguimos las instrucciones del kit para la purificación de ácidos nucleicos. En primer lugar, centrifugamos los tubos *PAXgene Blood RNA Tubes* durante 10 minutos a 3000-5000 x g con un rotor oscilante. Para garantizar una hemólisis completa, nos tenemos que asegurar de que la muestra de sangre ha estado en la mesa incubándose durante al menos 2 horas a temperatura ambiente (15-25°C).

Después, retiramos el sobrenadante por decantación o pipeteo. Añadimos 4 ml de agua libre de ARNasa al pellet y agitamos el tubo en el vórtex hasta que el pellet se disuelva. Centrifugamos durante 10 minutos a 3000-5000 x g. Aspiramos y desechamos todo el sobrenadante.

A continuación, añadimos 350 µl de tampón de resuspensión, y agitamos con el vortex hasta que el pellet esté disuelto totalmente. Pipeteamos la muestra en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y añadimos 300 µl de tampón de unión y 40 µl de proteinasa K. Agitamos en el vortex durante 5 segundos para mezclar e incubamos durante 10 minutos a 55°C en el bloque térmico con agitador a 400 rpm.

Depositamos el lisado directamente en una columna *PAXgene Shredder spin column* provista por el kit y centrifugamos 3 minutos a velocidad máxima (sin exceder las 20000 x g).

Transferimos cuidadosamente todo el sobrenadante de la fracción eluida a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml nuevo.

Añadimos 350 µl de etanol (96% de pureza), mezclamos con el vortex y centrifugamos brevemente (1-2 segundos a 500-1000 x g) para eliminar las gotas del interior de la tapa del tubo. La centrifugación no debe durar más de 1-2 segundos, ya que podría formarse un pellet de ácidos nucleicos que reduciría el rendimiento del ARN total.

Pipeteamos los 700 μl de muestra en una columna *PAXgene RNA spin column* y centrifugamos 1 minuto a 8000-20000 x g. Colocamos la columna en un tubo de procesado de 2 ml nuevo y desecharmos el tubo de procesado anterior que contenía el eluido.

Pipeteamos el resto de la muestra en una columna *PAXgene RNA spin column* y centrifugamos durante 1 minuto a 8000-20000 x g. Colocamos la columna en un tubo de 2 ml de procesado nuevo y deseche el tubo de procesado anterior.

Pipeteamos 350 μl de tampón de lavado 1 dentro de la columna y centrifugamos durante 1 minuto a 8000-20000 x g. Desechamos el tampón eluido.

Añadimos 10 μl de la solución madre de DNasa I a 70 μl de tampón de digestión de ADN en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Mezclamos por inversión y lo centrifugamos brevemente para recoger el líquido residual de las paredes del tubo.

Pipeteamos la mezcla (80 μl) directamente en la membrana de una columna *PAXgene RNA spin column* y la dejamos durante 15 minutos a temperatura entre 20-30°C.

Pipeteamos 350 μl del tampón de lavado 1 en la columna *PAXgene RNA spin column* y centrifugamos durante 1 minuto a 8000-20000 x g. Colocamos la columna en un tubo de procesado nuevo y desecharmos el anterior.

Pipeteamos 500 μl de tampón de lavado 2 y centrifugamos durante 1 minuto a 8000-20000 x g. Colocamos la columna en un tubo de procesado nuevo y desecharmos el anterior.

Volvemos a añadir 500 μl de tampón de lavado 2 a la columna y centrifugamos durante 3 minutos a 8000-20000 x g.

Desechamos el tubo de procesado y colocamos la columna en un tubo de procesado nuevo. Lo centrifugamos durante 1 minuto a 8000-20000 x g.

Desechamos el tubo de procesado que contenía el eluido y colocamos la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Añadimos 40 μl de tampón de elución directamente en la membrana y centrifugamos durante 1 minuto a 8000–20000 x g para eluir el ARN.

Repetimos el paso de elución anterior usando 40 μl de tampón de elución.

Incubamos la muestra durante 5 minutos a 65 °C para la desnaturalización de ARN en el bloque térmico. Después de incubarlo, lo ponemos inmediatamente en hielo.

Si las muestras de ARN no van a utilizarse inmediatamente, las guardamos a -20 o -80°C. Como el ARN se mantiene desnaturalizado después de congelar y descongelar varias veces, no es necesario repetir la incubación a 65 °C.

Para una cuantificación precisa del ARN por absorbancia a 260 nm, diluimos la muestra en 10mM Tris-Cl, pH 7,5 y la cuantificamos mediante el espectrofotómetro *NanoDrop ND1000*, *NanoDrop Technologies*. Para la confirmación de la calidad se utilizó el bioanalizador *RNA 6000 Nano Bioanalyzer* (Agilent Technologies).

Partimos de 200 ng de ARN total con un RIN (número de integridad del ARN) de entre 7,3 y 8,4 para obtener ARN complementario marcado con *Cyanine 3-CTP* (*Cyanine 3-Aminoallylcytidine-5'-Triphosphate*) usando el kit *Low Input Quick Amp Labelling Kit, One-Color* (Agilent p/n 5190-2305).

A continuación, siguiendo las instrucciones del kit de *array* comercial *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* (Agilent p/n G4140-90040), 600 ng de ARN complementario marcado se hibridan con el *SurePrint G3 Human Gene Expression Microarrays v3 8X60K* (Agilent p/n G4858A-072363). Para más información sobre este diseño, visitar la página web <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?crumbAction=push&pageId=1516>.

El array fue escaneado en el escáner *Agilent Microarray Scanner* (Agilent G2565C) de acuerdo con la instrucciones del fabricante y los datos fueron analizados usando el software *Agilent Feature Extraction Software* 11.5.1.1.

12. Estudio de poblaciones leucocitarias a partir de sangre total mediante citometría de flujo

Para el estudio de las poblaciones leucocitarias utilizamos la técnica de inmunodetección mediante la citometría de flujo. Las células aisladas pasan por el interior de una corriente, a través de un sensor que detecta una propiedad específica. En este caso la medida se realiza a través de la excitación de fluorocromos incorporados a la célula que marcan una proteína a través de la cual, obtenemos una medida indirecta del tipo celular que nos interesa.

Partimos de sangre total extraída en un tubo que contiene EDTA para impedir la coagulación de la muestra y acto seguido procedemos a incubar las células con los anticuerpos

seleccionados para después, pasar la muestra por el citómetro (Gallios flow cytometer, Beckman Coulter).

Es importante tener en cuenta la autofluorescencia de la propia muestra, para lo cual, pondremos 50 µl de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro. Añadimos 2 mL de BD FACS Lysing Solution 1x (BD Biosciences) como solución de lisis e incubamos 10 minutos en oscuridad a TA. Pasaremos por el citómetro esta muestra como control negativo de la posible autofluorescencia de la muestra biológica para considerar solamente la fluorescencia emitida por la excitación del fluoróforo unido a nuestra proteína de estudio.

Para el análisis posterior utilizamos el software Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter).

12.1. Estudio cuantitativo de cada una de las poblaciones leucocitarias.

Para el estudio general de las poblaciones leucocitarias partimos de 50 µl de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro donde añadimos los siguientes anticuerpos:

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en citometría.

ANTICUERPO	FLUORÓFORO	CASA COMERCIAL
CD45	KO	Beckman Coulter
CD14	PB	Biolegend
CD19	APC AlexaFluor700	Beckman Coulter
CD3	APC	Biolegend
CD4	ECD	Beckman Coulter
CD8	PC7	Beckman Coulter
CD56	PE	Immunostep

Añadimos 2 mL de BD FACS Lysing Solution 1x (BD Biosciences) y dejamos incubar 10 minutos a TA y en oscuridad. Añadimos 50 µl de *Flow Count* (Beckman Coulter), para la cuantificación exacta de células por microlitro y medimos en citómetro. Identificamos las poblaciones como se explica a continuación:

- Leucocitos: son células marcadas con CD45.
- Neutrófilos: se reconocen por la morfología dentro de la población CD45+.

- Monocitos: además de reconocerse por la morfología dentro de la población CD45+ los marcamos específicamente con CD14 y CD16.
- Linfocitos: se reconocen por la morfología dentro de la población CD45+ y dentro de ellos subdividimos la población en:
 - Linfocitos B: marcados con CD19 dentro de población acotada para linfocitos.
 - Linfocitos T: marcados con CD3 dentro de la población acotada para linfocitos.
 - Linfocitos T CD4: son células CD4+ y CD8- dentro de la población de linfocitos T (CD3+).
 - Linfocitos T CD8: son células CD8+ y CD4- dentro de la población de linfocitos T (CD3+).
 - *Natural Killers* (NK): marcados con CD56 dentro de población acotada para linfocitos.

12.2. Estudio de marcadores de activación de las diferentes poblaciones celulares.

Para este estudio partimos de la misma muestra añadiendo además un anticuerpo (contra CD69) que nos indica el grado de activación de las diferentes poblaciones reconocidas según el protocolo anterior. Procedemos de la misma manera que en el apartado 12.1.

ANTICUERPO	FLUOROFORO	CASA COMERCIAL
CD69	Alexa flúor 488	Biolegend

12.3. Estudio de la población de monocitos

Partimos de 50 µl de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro donde añadimos los siguientes anticuerpos:

ANTICUERPO	FLUOROFORO	CASA COMERCIAL
CD45	KO	Beckman Coulter
CD14	PB	Biolegend
CD16	APC	Beckman Coulter
CD56	PE	Immunostep

Añadimos 2 mL de BD FACS Lysing Solution 1x (BD Biosciences) y dejar incubar 10 minutos a TA y en oscuridad. Añadimos 50 µl de *Flow Count* (Beckman Coulter), para la cuantificación exacta de células por microlitro y medimos en citómetro.

En este caso la población de interés son los monocitos, que en un primer momento identificamos por la morfología dentro de la población de células CD45+. Corroboramos la población excluyendo a linfocitos y neutrófilos gracias al CD14 y CD16 y eliminamos también la población de las NK identificándolas con el CD56.

Una vez que tenemos acotada la población de monocitos, queremos ver tres estadios diferentes, según van perdiendo el CD14 van adquiriendo el CD16:

- -Monocitos clásicos: CD14⁺⁺CD16⁻
- -Monocitos intermedios: CD14⁺CD16⁺
- -Monocitos no clásicos: CD14⁻CD16⁺⁺

12.4. Estudio de la población de linfocitos T

Para el estudio más exhaustivo de la población linfocitaria llevamos a cabo un nuevo protocolo con una serie de anticuerpos específicos para cada una de las subpoblaciones celulares de los linfocitos T y su estado de maduración y activación.

12.4.1. Poblaciones *naïve* y de memoria

Partimos de 50 µl de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro donde añadimos los siguientes anticuerpos:

ANTICUERPO	FLUOROFORO	CASA COMERCIAL
CD45	KO	Beckman Coulter
CD3	APC	Biolegend
CD4	ECD	Beckman Coulter
CD45RO	APCCY7	Biolegend
CD45RA	PERCPCy5.5	Biolegend
CD62L	FITC	Biolegend
CCR7	PECy7	Biolegend

Añadimos 2 mL de BD FACS Lysing Solution 1x (BD Biosciences) y dejamos incubar 10 minutos a TA y en oscuridad. Añadimos 50 µl de *Flow Count* (Beckman Coulter), para la cuantificación exacta de células por microlitro y medimos en citómetro. Identificamos las poblaciones como se explica a continuación:

Primero identificamos la población de linfocitos por morfología dentro de las células CD45+, después la de linfocitos T (CD3+) y separamos en una población CD4+ (linfocitos CD4 o *helper*) y otra CD4- (linfocitos CD8 o citotóxicos). A partir de ahí estudiamos las siguientes poblaciones específicas:

- Linfocitos CD4 *naive*: son los linfocitos T CD4+CD45RA+CD45RO-
- Linfocitos CD4 de memoria: son los linfocitos T CD4+CD45RA-CD45RO+
- Linfocitos CD4 de memoria central (MC): son los linfocitos T CD4+CD45RO+CD62L+CCR7+
- Linfocitos CD4 de memoria efectora (ME): son los linfocitos T CD4+CD45RO+CD62L-CCR7-
- Linfocitos CD8 *naive*: son los linfocitos T CD4-CD45RA+CD45RO-
- Linfocitos CD8 de memoria: son los linfocitos T CD4-CD45RA-CD45RO+
- Linfocitos CD8 de memoria central (MC): son los linfocitos T CD4-CD45RO+CD62L+CCR7+
- Linfocitos CD8 de memoria efectora (ME): son los linfocitos T CD4-CD45RO+CD62L-CCR7-

12.4.2. Linfocitos T auto-reactivos

Para identificar esta población partimos de los 50 µl de sangre EDTA del protocolo descrito en el apartado 9.3.1 y añadimos además el anticuerpo:

ANTICUERPO	FLUOROFORO	CASA COMERCIAL
CD28	PB	Biolegend

Procedemos de la misma manera y finalmente identificamos dos poblaciones dentro de los linfocitos T (CD3+):

- Linfocitos CD4 carentes de las molécula coestimuladora CD28: CD4+CD28-
- Linfocitos CD8 carentes de las molécula coestimuladora CD28: CD4-CD28-

12.4.3. Linfocitos T reguladores (Treg)

Para el estudio de un tipo celular concreto de linfocitos CD4, las células Treg, se llevó a cabo un panel nuevo de anticuerpos procediendo a tratar la sangre de manera similar a la descrita hasta ahora para las subpoblaciones de linfocitos T. Llevamos a cabo dos protocolos distintos:

- Inmuno-detección de superficie: Partimos de 50 µl de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro donde añadimos los siguientes anticuerpos:

ANTICUERPO	FLUOROFORO	CASA COMERCIAL
CD45	KO	Beckman Coulter
CD4	ECD	Beckman Coulter
CD25	PE	Biolegend
CD127	APCeFluor78	Affymetrix eBioscience

Añadimos 2 mL de BD FACS Lysing Solution 1x (BD Biosciences) y dejamos incubar 10 minutos a TA y en oscuridad. Añadimos 50 µl de *Flow Count* (Beckman Coulter), para la cuantificación exacta de células por microlitro y medimos en citómetro.

Identificamos mediante morfología los linfocitos dentro de la población CD45+ y a partir de ahí, la población de estudio mediante marcadores de superficie celular, los linfocitos T reguladores CD4+CD25^{high}CD127^{low}

- Inmuno-detección intracelular: Partimos de 100 µl de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro donde añadimos los siguientes anticuerpos:

ANTICUERPO	FLUOROFORO	CASA COMERCIAL
CD45	KO	Beckman Coulter
CD4	ECD	Beckman Coulter
CD25	PE	Biolegend

Añadimos tras la permeabilización

FOXP3	Alexa flúor 488	BD
-------	-----------------	----

Tras la incubación habitual con los anticuerpos de superficie, ahora es necesario seguir un protocolo extra para la permeabilización de la célula para la inmunodetección de un factor de transcripción intracelular, el FoxP3 que nos sirve también como medida indirecta de las Treg.

Añadimos 2 mL de *Stain Buffer (Human FoxP3 Buffer Set BD Pharmingen™)* para lavar. Centrifugamos a 250 x g, 10 minutos y eliminamos el buffer de lavado.

Para fijar las células, resuspendemos el pellet en el buffer residual y añadimos 2 mL de 1x *Human FoxP3 Buffer A (Human FoxP3 Buffer Set BD Pharmingen™)* e incubamos 10 minutos a TA, protegido de la luz. Centrifugamos a 500 x g, 5 minutos y quitamos el fijador. Para lavar las células, resuspendemos el pellet en 2 mL del buffer y centrifugamos a 500 x g, 5 minutos y eliminamos el sobrenadante.

Para permeabilizar las células, resuspendemos el pellet en el buffer residual y añadimos 0,5 mL of 1X *working solution Human FoxP3 Buffer C (Human FoxP3 Buffer Set BD Pharmingen™)* e incubamos 30 minutos a TA protegido de la luz. Volvemos a repetir el paso de lavado y añadimos el anticuerpo anti FoxP3 (ver Tabla). Incubamos 30 minutos a TA protegido de la luz. Repetimos el paso de lavado, resuspendemos en buffer y añadimos 100 µL de *Flow Count (Beckman Coulter)*, para la cuantificación exacta de células por microlitro. Finalmente medimos en citómetro.

Identificamos mediante morfología los linfocitos dentro de la población CD45+ y a partir de ahí miramos el % de células positivas para FoxP3 acotado para linfocitos, para linfocitos T CD4 (CD4+FoxP3+) y para linfocitos T CD4 T reguladores (CD4+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3+). Además de la intensidad de emisión del fluoróforo para FoxP3 en las Treg.

Además de los porcentajes de células positivas, también podemos saber el número de células positivas por µL gracias al *Flow Count (Beckman Coulter)*.

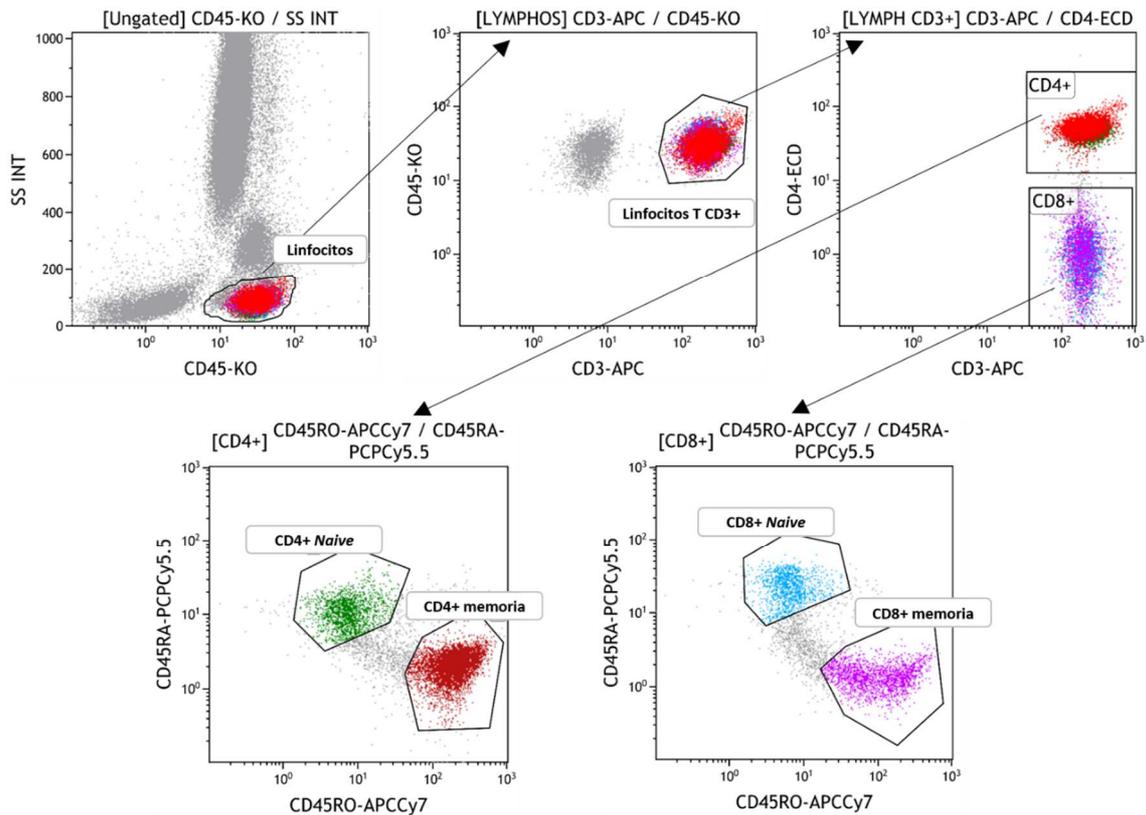


Figura 13. Citometría. Ejemplo de estrategia de selección para los linfocitos CD4 y CD8 *naive* y de memoria.

13. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm EEM (error estándar de la media) del número de sujetos indicados en cada caso. Se realiza un análisis ANOVA de una vía seguido de test de Tukey para comparar medias poblacionales por parejas cuando comparamos más de dos grupos a la vez o utilizamos el test de Student cuando comparamos las medias de dos grupos entre sí.

Utilizamos estos análisis estadísticos porque asumimos homogeneidad y homocedasticidad de la muestra. La n de la muestra es lo suficientemente grande como para asumir normalidad en la distribución de la muestra y lo corroboramos con el test de Shapiro-Wilk. Con el test de Levene comprobamos la igualdad de varianzas.

Para las correlaciones hemos llevado a cabo un análisis de correlación bivariada con el coeficiente de correlación de Spearman en el caso de ser variables discretas o de Pearson, en el caso de ser variables continuas. El intervalo de confianza es del 95%.

Para analizar la capacidad diagnóstica de las variables se han utilizado las curvas COR (Característica Operativa del Receptor) con un intervalo de confianza del 95%. También se han hecho regresiones logísticas multivariadas y univariadas utilizando la presencia de EHM como variable dependiente.

Para la corrección de los p valores del estudio de transcriptómica, con el fin de evitar falsos positivos, se llevó a cabo un test múltiple de corrección de p valor propuesto por Benjamini y Hochberg en 1995 para obtener los p valores ajustados.

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas estadísticos Graphpad Prism 5 y SPSS *Statistics 22*.

IV. Resultados

1. Estudio de la cohorte de pacientes y controles

1.1. Composición de los diferentes grupos y etiología de la enfermedad hepática.

Se muestra en la Tabla 10 la composición de los diferentes grupos experimentales: controles, pacientes sin EHM (S_EHM) y pacientes con EHM (EHM). No existen diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto a sexo ni edad. Las etiologías principales de los cirróticos que participan en el estudio son el alcohol y los virus de la hepatitis C o B. También mostramos datos del Child Pugh y el MELD, donde tampoco vemos diferencias significativas entre los dos tipos de pacientes.

Tabla 10. Cohorte de controles y pacientes implicados en el estudio.

	Controles	Pacientes	
		S_EHM	EHM
Total de individuos	98	125	62
Sexo (M/F)	51/47	99/26	43/19
Edad [¶]	57 ± 1	60 ± 1	64 ± 1
Alcohol	-----	56	25
HBV/ HCV	-----	51	22
Alcohol +HBV/ HCV	-----	4	6
Otros		14	9
Child Pugh A/B/C	-----	103/22/0	41/17/4
MELD [¶]	-----	9 ± 0,3	10 ± 0,4

[¶]Los valores se expresan en media±EEM. M, masculino; F, femenino; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus. MELD, *model end stage liver disease*.

1.2. Características clínicas.

No hay indicios de mayor daño hepático en los pacientes con EHM comparados con los pacientes sin EHM. A continuación mostramos en la Tabla 11 los niveles de las enzimas hepáticas, y otros marcadores más generales de inflamación o daño hepático.

Tabla 11. Niveles en sangre de los marcadores de daño hepático y endotoxemia.

	Controles	Pacientes	
		S_EHM	EHM
PCR (mg/L)	2,1 ± 0,35	4,0 ± 0,8*	4,0 ± 0,9*
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,58 ± 0,07	1,21 ± 0,11**	1,21 ± 0,14*
ALT (U/L)	19 ± 2	35 ± 6*	41 ± 7*
AST (U/L)	21 ± 2	50 ± 9*	61 ± 9*
Fosfatasa alcalina (mU/mL)	98 ± 18	242 ± 28**	259 ± 27**
GGT (U/L)	24 ± 3	156 ± 35*	145 ± 34*
Amonio (µmol/L)	11 ± 0,5	26 ± 2***	33 ± 3***
LPS (EU/mL)	0,65 ± 0,1	1,23 ± 0,2*	1,7 ± 0,3*

Los valores están expresados en media±EEM. S_EHM, sin encefalopatía hepática mínima; EHM, encefalopatía hepática mínima; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma-glutamyl transpeptidasa; PCR, proteína C reactiva. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas con el control. No existen diferencias entre los dos tipos de pacientes en ningún caso. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

En primer lugar analizamos los marcadores clínicos de función hepática a partir de las analíticas de sangre de los pacientes cedidas por el hospital y observamos que no existen diferencias significativas entre los pacientes con EHM y el grupo sin EHM. Sin embargo, como cabe esperar, ambos tipos de pacientes tienen aumentados los parámetros estudiados (PCR, bilirrubina total, ALT, AST, FA, GGT) respecto a los controles (ver valores en Tabla 11).

En segundo lugar, estudiamos los niveles de amonio en sangre ya que es el principal contribuyente de las alteraciones cerebrales en la EH. Ambos tipos de pacientes presentan unos niveles de amonio muy elevados respecto al control ($p < 0,001$ en ambos casos) y aunque en pacientes con EHM el aumento es mayor, no encontramos diferencias significativas entre ellos, lo que cabe esperar a la vista de que el daño hepático no es mayor en los pacientes que empiezan a presentar deterioro cognitivo.

En tercer lugar, medimos los niveles de LPS en suero para comprobar si esta era la causa de la activación del sistema inmunológico en los pacientes con EHM y vimos que los niveles de LPS estaban aumentados de la misma manera en pacientes con y sin EHM respecto a los controles. Por lo que no podemos asociar un aumento de endotoxemia en sangre con la alteración cognitiva en nuestros pacientes (ver Tabla 11).

1.3. Estudio de alteraciones cognitivas y motoras

Para el estudio de las capacidades cognitivas y motoras en los pacientes cirróticos y en los controles llevamos a cabo una serie de test psicométricos explicados en el apartado 3 y 4 de material y métodos. Los resultados de las pruebas se muestran en la siguiente Tabla.

Tabla 12. Alteraciones cognitivas y motoras.

Test	CONTROL	S_EHM (<i>p</i> vs. CRT)	EHM (<i>p</i> vs. CRT)	<i>p</i> EHM vs. S_EHM
Alteraciones cognitivas				
PHES [§]	0 ± 0,2	-1 ± 0,1 (<i>p</i> =0,002)	-7 ± 0,3 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
DST [§]	0 ± 0,1	0 ± 0,04 (ns)	-1 ± 0,1 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
NCT-A [§]	0 ± 0,04	0 ± 0,03 (ns)	-1 ± 0,1 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
NCT-B [§]	0 ± 0,1	0 ± 0,1 (ns)	-2 ± 0,2 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
SD [§]	0 ± 0,03	0 ± 0,04 (ns)	-1 ± 0,1 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
LTT [§]	0 ± 0,1	0 ± 0,1 (ns)	-2 ± 0,1 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Stroop				
Tarea congruente [•]	112 ± 4	103 ± 2 (<i>p</i> =0,046)	79 ± 3 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Tarea neutra ^{••}	82 ± 2	73 ± 2 (<i>p</i> =0,05)	58 ± 2 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Tarea incongruente ^{•••}	46 ± 1	40 ± 1 (<i>p</i> =0,01)	31 ± 1 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Interferencia ^{••••}	0,34 ± 0,8	-2,6 ± 0, (<i>p</i> =0,04)	-3 ± 0,9 (<i>p</i> =0,04)	Ns
Test de claves oral				
Aciertos	51 ± 1	40 ± 1 (<i>p</i> <0,001)	24 ± 1 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Errores	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2 (ns)	1,6 ± 0,2 (<i>p</i> =0,022)	Ns
D2				
Total de respuestas	355 ± 31	314 ± 13 (ns)	185 ± 26 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Total de aciertos	130 ± 11	115 ± 4 (ns)	73 ± 7 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Omisiones	24 ± 6	21 ± 4 (ns)	25 ± 6 (ns)	Ns
Comisiones	1 ± 0,3	5 ± 1 (ns)	12 ± 4 (<i>p</i> =0,013)	Ns
Efectividad total en la prueba ^Δ	365 ± 19	301 ± 10 (<i>p</i> =0,006)	194 ± 17 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Índice de concentración ^{ΔΔ}	133 ± 8	111 ± 4 (<i>p</i> =0,041)	61 ± 8 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Test de dígitos oral				
Aciertos test directo	9 ± 0,3	7,8 ± 0,2 (<i>p</i> =0,001)	6,8 ± 0,3 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> =0,003
Aciertos test inverso	6,2 ± 0,4	4,9 ± 0,1 (<i>p</i> <0,001)	3,5 ± 0,2 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Test de letras y números oral				
Aciertos	9,9 ± 0,4	7,2 ± 0,2 (<i>p</i> <0,001)	4,8 ± 0,4 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Alteraciones motoras				
Coordinación bimanual (min)	1,8 ± 0,03	2 ± 0,04 (ns)	3 ± 0,18 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001
Coordinación visomotora (min)	2,3 ± 0,07	2,6 ± 0,06 (ns)	3,6 ± 0,13 (<i>p</i> <0,001)	<i>p</i> <0,001

[§]Valores ajustados según el cálculo estándar del PHES. [•]Número de palabras ^{••}Número de colores, ^{•••}Número de ítems, ^{••••}Valor calculado. ^ΔTOT: valor calculado, ^{ΔΔ}CON: valor calculado. DST: Test de Dígitos y Símbolos, NCT-A: Test de conexión numérica A, NCT-B: Test de conexión numérica B, SD: Test de puntos seriados, LTT: Test de línea quebrada, ns: no significativo.

1.3.1. Alteraciones cognitivas en pacientes con EHM

En primer lugar utilizamos la batería de test del PHES para la clasificación de los pacientes con y sin EHM, como se ha explicado anteriormente. Como vemos en la Tabla 12, los pacientes sin EHM ya presentan una pequeña diferencia respecto a los controles en la puntuación general del PHES, pero no se ve reflejada en ninguno de los cinco test de la batería en particular, donde la media de las puntuaciones de los pacientes sin EHM no difiere de la de los controles. Por el contrario, los pacientes con EHM (puntuación del PHES menor o igual a -4) presentan una gran diferencia respecto tanto a la población control, como a los pacientes sin EHM en la puntuación general del PHES ($-7 \pm 0,3$, $p < 0,001$) y en la de cada uno de los cinco subtest que componen la batería del PHES: el test de dígitos y símbolos, el test de conexión numérica A, el test de conexión numérica B, el test de puntos seriados y el test de línea quebrada. En todos ellos vemos un empeoramiento de cada una de las tareas en los pacientes con EHM respecto a controles y pacientes sin EHM.

1.3.1.1. Atención selectiva

Para la evaluación de la atención selectiva y la flexibilidad cognitiva, se utilizó el test de Stroop de colores y palabras (Stroop, 1935). Los resultados indican que los pacientes con EHM muestran un déficit en la atención selectiva, obteniendo peores resultados en el test que los sujetos control y que los pacientes sin EHM (ver datos en Tabla 12), los cuales muestran también una deficiencia de atención selectiva respecto a los controles, pero no tan agravada como en los pacientes con EHM (ver datos en Tabla 12).

Otra prueba de atención selectiva y velocidad de procesamiento mental es el test de Claves oral. Este test pertenece a la batería WAIS (*Wechsler Adult Intelligence Scale*) que evalúa diferentes funciones cognitivas. Los pacientes con EHM tienen un importante déficit de atención y en la velocidad de procesamiento en comparación con los controles y con los pacientes sin EHM. Los pacientes sin EHM también presentan menor velocidad de procesamiento, ya que no son capaces de realizar tantos aciertos como los controles. Observamos una media de 24 aciertos por parte de los pacientes con EHM y unos 40 aciertos por parte de los pacientes sin EHM en la realización de este test. Los controles en cambio, tienen una media de 51 aciertos en el tiempo establecido.

1.3.1.2. Atención selectiva-sostenida y concentración mental

Para evaluarla utilizamos el test d2. Los resultados de este test, indican un déficit en la atención selectiva/sostenida y la concentración mental en los pacientes con EHM en comparación con los controles, como vemos en un menor número de respuestas y de aciertos y mayor número de fallos de comisión. Los pacientes sin EHM también muestran cierto déficit en comparación con los controles, ya que se encuentran en percentiles inferiores en parámetros que miden la efectividad total de la prueba (TOT) y el índice de concentración (CON), sin embargo, estos parámetros muestran un empeoramiento mayor en los pacientes con EHM (ver Tabla 12).

1.3.1.3. Memoria de trabajo

Evaluamos la memoria de trabajo mediante el test de Dígitos oral y el test de Letras y Números oral (batería WAIS). En pacientes sin EHM ya existe un empeoramiento en el número de aciertos, tanto directos como inversos, en ambos tipos de test. En pacientes con EHM el número de aciertos es menor que en pacientes sin EHM y controles, mostrando una diferencia significativa con ambos grupos. En el test de letras y número los pacientes con EHM tuvieron una media de casi 5 aciertos en total, mientras que los pacientes sin EHM tuvieron una media de unos 7 aciertos y los controles de casi 10 aciertos, el doble que en pacientes con EHM.

1.3.2. Alteraciones motoras en pacientes con EHM

Evaluamos la coordinación motora mediante los test bimanual y visomotor. En ambos test los pacientes con EHM necesitan un tiempo bastante superior para realizar las tareas en comparación a los pacientes sin EHM y los controles. Tardaron unos 3 minutos en realizar el test bimanual y casi 4 minutos en el visomotor, mientras que los pacientes sin EHM tardaron 2 y 3 minutos, respectivamente y los controles alrededor de 2 minutos en ambos test.

2. Estudio de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica

2.1. Análisis cuantitativo de las poblaciones leucocitarias en sangre

Analizamos mediante citometría de flujo, todas las poblaciones leucocitarias en sangre y vimos que los pacientes, tanto con EHM como sin EHM, presentaban una disminución en el número total de leucocitos. Atendiendo a las poblaciones por separado, observamos una bajada en el número de células en linfocitos totales y en neutrófilos. Dentro de los linfocitos observamos una disminución de aproximadamente el 30-40% en linfocitos T, tanto CD8 como CD4 y de algo más del 20% en linfocitos B. Los datos nos muestran una bajada significativa para los dos tipos de pacientes, más pronunciada en los pacientes con EHM, sin embargo, no hay diferencias estadísticas entre ellos (ver Tabla 13).

Ya que los linfocitos son el tipo celular en el que se centra esta tesis, analizamos las poblaciones de los diferentes subconjuntos y observamos que, de nuevo, los dos tipos de pacientes presentan el mismo grado de linfopenia. Vemos disminuido el número total de linfocitos en sangre en las poblaciones *naive*, de memoria (memoria central y memoria efectora) y negativos para CD28, tanto en los CD4, como en los CD8 (ver Tabla 13).

Podemos concluir que la leucopenia en pacientes cirróticos no está asociada a la aparición de EHM.

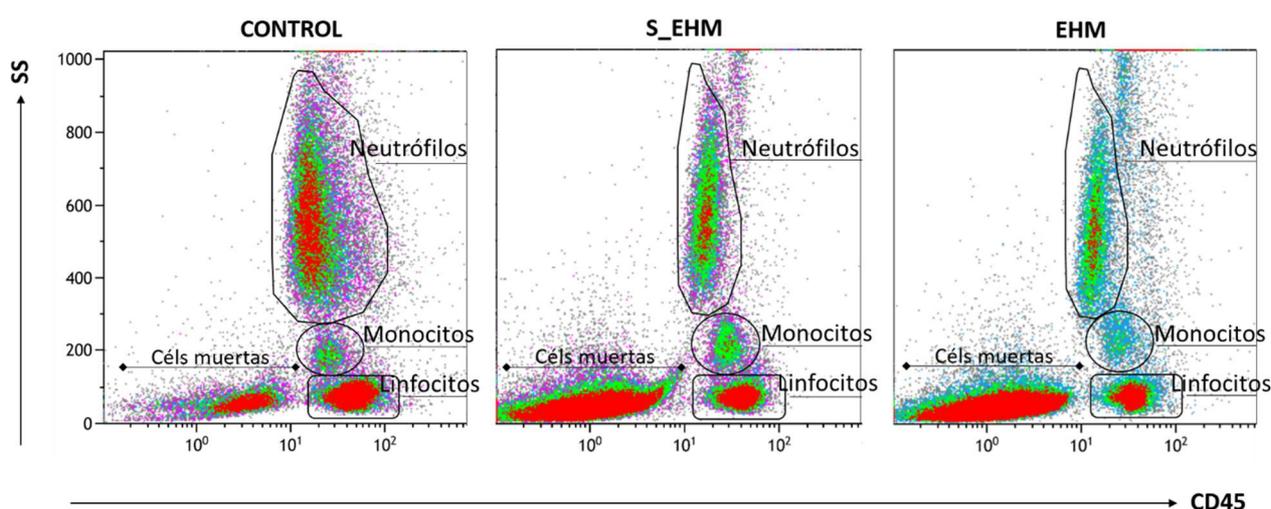


Figura 14. Poblaciones leucocitarias en los tres grupos experimentales. Imágenes de citometría. SS, *Side Scatter* o detectores de dispersión lateral vs. CD45. S_EHM, sin encefalopatía hepática mínima. EHM, encefalopatía hepática mínima. Células, células.

Tabla 13. Niveles en sangre de las diferentes poblaciones leucocitarias.

	Media±SEM (x10 ⁹ /L)			% de disminución respecto a los controles	
	Controles	S_EHM (<i>p</i> vs. CRT)	EHM (<i>p</i> vs. CRT)	S_EHM	EHM
Leucocitos	7±0,3	5±0,4 ***	4,7±0,3 ***	27±6,2	33±4,3
Linfocitos	2,3±0,1	1,6±0,2 ***	1,3±0,1 ***	31±7,1	42±5,7
Monocitos	0,5±0,03	0,5±0,04	0,4±0,03	2,1±9,3	14±6,3
Neutrófilos	4±0,3	2,8±0,3 ***	2,7±0,2 ***	28±7,1	31±6,1
Linfocitos T	1,6±0,1	1,1±0,1 ***	0,9±0,1 ***	31±7,2	41±5,9
Linfocitos T CD4	1,1±0,06	0,8±0,07 ***	0,6±0,06 ***	30±6,6	41±5,1
Linfocitos T CD8	0,6±0,04	0,4±0,06 **	0,4±0,05 ***	33±10,1	40±8,1
Linfocitos B	0,24±0,02	0,18±0,04*	0,19±0,03 *	21±12,7	24±11,9
NKs	0,02±0,004	0,02±0,004	0,02±0,002	0	0
Linfocitos T CD4					
<i>Naive</i>	4,5±0,7	1,2±0,3 ***	0,9±0,2 ***	20±5	28±6
Memoria	6,9±1	3,5±0,7 **	3,6±0,7 *	51±10	51±10
Memoria central	5,7±0,7	2,1±0,4 ***	2,7±0,6 **	47±11	36±7
Memoria efectora	1,8±0,4	0,7±0,2 *	0,6±0,3 *	31±19	37±9
CD4+CD28-	5,9±1,4	1,5±0,5 **	1,7±0,9*	29±14	26±9
Linfocitos T CD8					
<i>Naive</i>	3,2±0,3	1,8±0,40 *	1,6±0,2 *	49±8	55±13
Memoria	2,4±0,2	1,1±0,3**	1,1±0,3 *	48±12	44±11
Memoria central	0,9±0,1	0,4±0,1 ***	0,7±0,1 *	70±10	47±9
Memoria efectora	2,2±0,3	0,9±0,2 **	0,7±0,3 **	34±13	39±10
CD8+CD28-	4,3±0,6	2,2±0,6 *	2±0,4 *	47±10	50±14

S_EHM, sin encefalopatía hepática mínima. EHM, encefalopatía hepática mínima. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001

2.2. Distribución en porcentajes de las poblaciones leucocitarias en sangre

En el porcentaje de cada una de las poblaciones estudiadas respecto al total de leucocitos, observamos que había un ligero aumento significativo en la población de monocitos, en ambos tipos de pacientes ($7\pm 0,4$ en controles, $10\pm 0,7$ ($p<0,01$) en pacientes sin EHM y $10\pm 0,5$ ($p<0,01$) en pacientes con EHM) (datos expresados en % de media \pm EEM).

En paralelo, hay una pequeña reducción en linfocitos totales que no llega a ser significativa ($34\pm 1,8$ en controles, $32\pm 1,7$ en pacientes sin EHM y 29 ± 2 en pacientes con EHM (datos expresados en % de media \pm EEM).

En el resto de poblaciones los porcentajes se mantienen sin cambios respecto al control, ni entre tipos de pacientes (ver Figura 15).

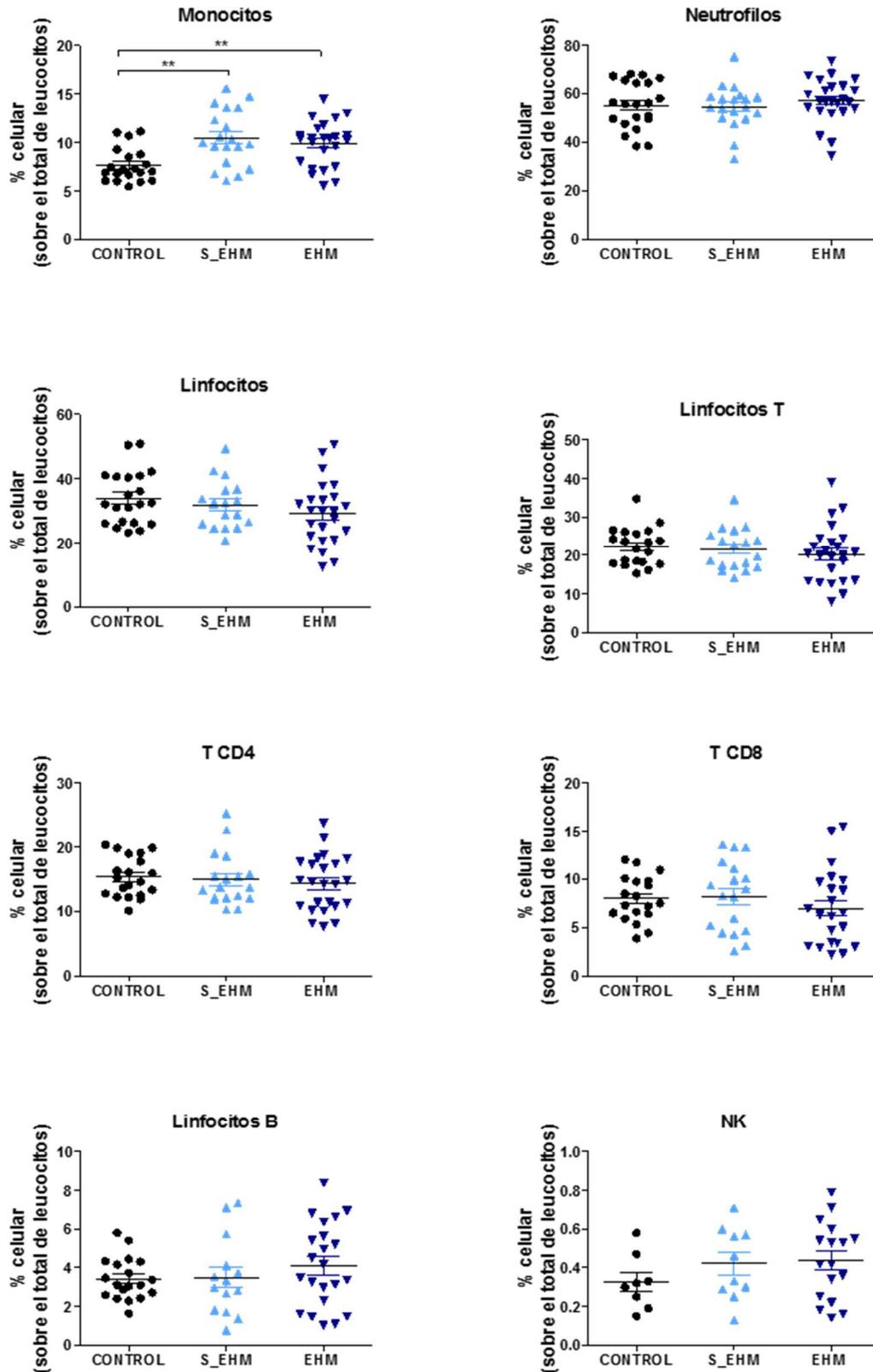


Figura 15. Porcentaje de los diferentes tipos celulares sobre el total de leucocitos. Porcentaje de monocitos, neutrófilos, linfocitos, linfocitos CD4, linfocitos CD8, linfocitos B y Nk sobre el total de leucocitos en sangre. S_EHM, sin encefalopatía hepática mínima. EHM, encefalopatía hepática mínima. ** $p < 0,01$.

2.3. Estudio de los monocitos en sangre periférica

➤ Población

Estudiamos la población de monocitos mediante citometría de flujo y de acuerdo a los marcadores CD14 y CD16, establecimos los tres subgrupos de monocitos circulantes. Los clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻), los intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) y los no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (Figura 16A).

Los pacientes cirróticos sin EHM mostraron un aumento en el porcentaje de monocitos intermedios pro-inflamatorios ($7 \pm 0.5\%$, $p < 0,05$) en comparación con los controles ($4,1 \pm 0,3\%$). En los pacientes con EHM el aumento del porcentaje de monocitos pro-inflamatorios fue mayor llegando hasta el $9,5 \pm 0,8\%$ ($p < 0,001$ respecto a controles y $p < 0,05$ respecto a los pacientes sin EHM).

En paralelo a este aumento, vimos una disminución en el porcentaje de los monocitos clásicos, no-inflamatorios, que suelen representar más del 90% de la población de monocitos, en pacientes sin EHM ($86,7 \pm 0,7\%$, $p < 0,05$) y más acusada en pacientes con EHM ($83,9 \pm 1,1\%$, $p < 0,001$ respecto a controles y $p < 0,05$ respecto a los pacientes sin EHM).

En el tercer grupo de monocitos no clásicos, de carácter anti-inflamatorio, no vimos ningún cambio, manteniendo un porcentaje de aproximadamente el 3% en todos los grupos (Figura 16).

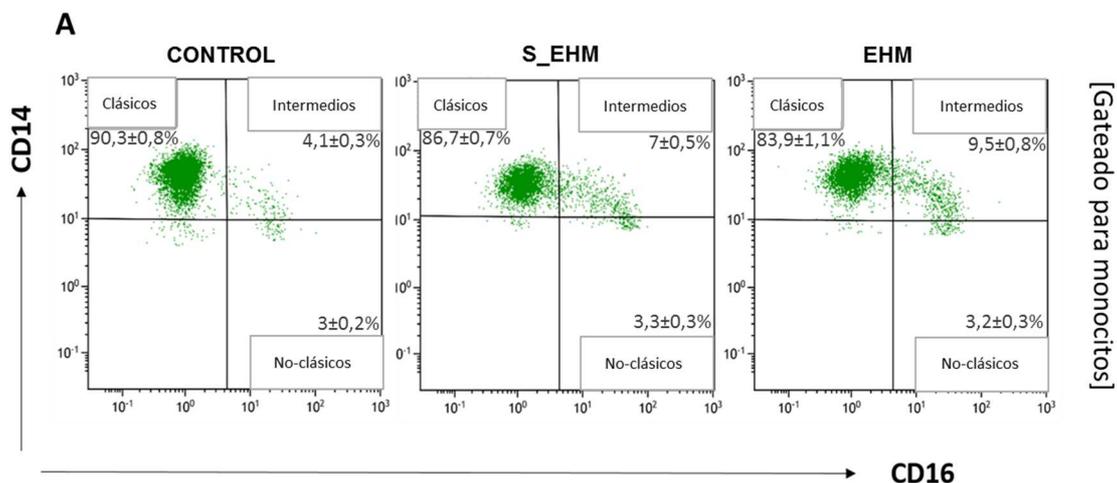


Figura 16A. Población de monocitos en sangre periférica. Imagen de citometría: CD14 vs CD16 acotada para monocitos para distinguir las tres subpoblaciones: clásicos, intermedios y no clásicos. Los datos se expresan en porcentajes de media ± EEM de cada población en cada grupo experimental.

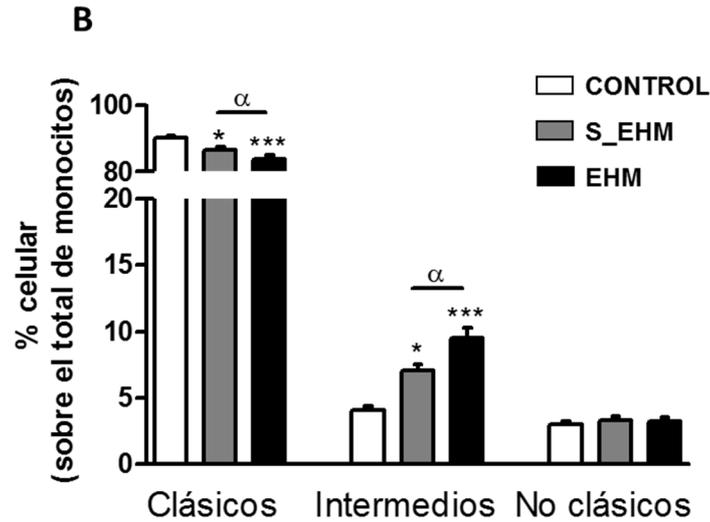


Figura 16B. Población de monocitos en sangre periférica. Gráfica de los diferentes subtipos de monocitos (clásicos, intermedios y no clásicos) en % celular sobre el total de monocitos. El * representa diferencias significativas entre pacientes y controles ($*p < 0,05$; $***p < 0,001$) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). ($\alpha p < 0,05$).

➤ Activación

El análisis de activación de monocitos con el marcador de activación temprana CD69, nos muestra que no hay diferencias en el porcentaje de células positivas para CD69 en ninguno de los tres grupos (Figura 17). Hay que tener en cuenta que este dato está tomado sobre el total de monocitos, donde la mayoría tiene el fenotipo no inflamatorio y no sobre cada uno de los subtipos celulares. Y que además, el CD69 se expresa de manera constitutiva en monocitos.

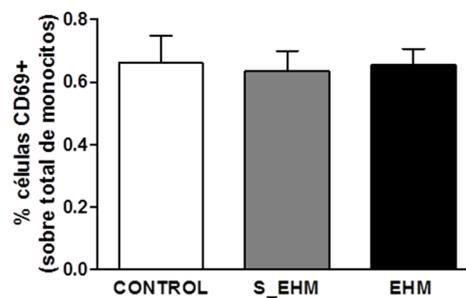


Figura 17. Porcentaje de células CD69+ sobre el total de monocitos.

2.4. Estudio de los linfocitos en sangre periférica

2.4.1. Linfocitos T

➤ Población

Como ya hemos visto previamente en el apartado anterior, los linfocitos T tienen una disminución del 30 y 40% en los pacientes sin y con EHM, respectivamente, respecto a los controles. Además, no hemos visto diferencia significativa en el porcentaje de los linfocitos T sobre los leucocitos totales en ninguno de los grupos experimentales (ver Figura 15).

Partiendo de esta base, vamos a estudiar los dos tipos principales de linfocitos T, los que presentan el receptor de membrana CD4 o linfocitos T *helper*, y los que presentan el receptor de membrana CD8 o linfocitos citotóxicos.

A partir de aquí, el primer paso, fue estudiar la distribución de estos dos tipos de linfocitos T y después, estudiamos sus poblaciones por separado. Vimos que la distribución de CD4 y CD8 en pacientes era la misma que en controles (Figura 18A), por lo que se mantiene el ratio de CD4/CD8 alrededor de 2 en los tres grupos experimentales (Figura 18B).

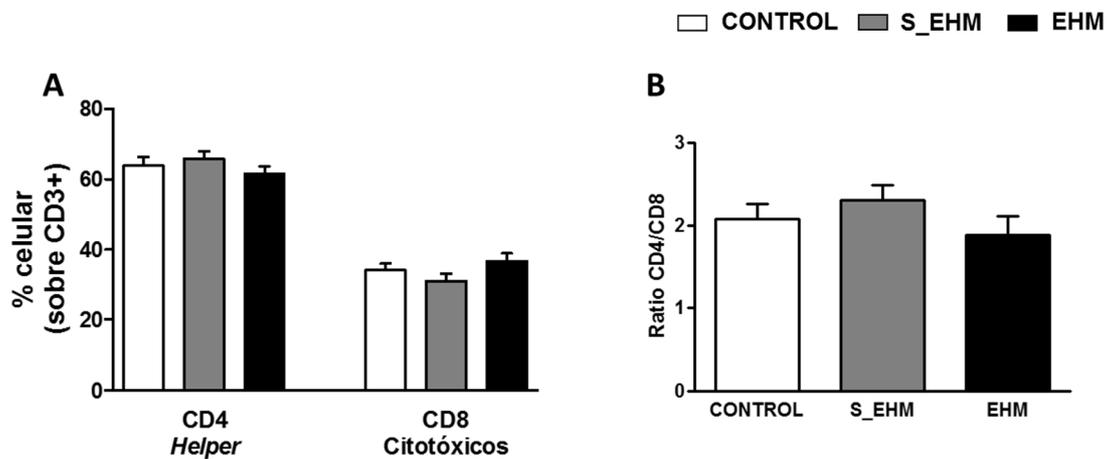


Figura 18. Linfocitos *helper* (CD4+) y citotóxicos (CD8+). A. Porcentaje de linfocitos CD4 y CD8 sobre el total de linfocitos T (CD3+). B. Ratio CD4/CD8 en los tres grupos experimentales.

➤ Activación

De nuevo, medimos la activación de la población de linfocitos T con el marcador de activación temprana CD69. Observamos que el porcentaje de células positivas para CD69, dentro

de la población de CD3, está aumentado de forma selectiva en los pacientes con EHM ($4,2\pm 0,9\%$) con un valor de $p<0,01$ respecto a controles ($1,6\pm 0,2\%$) y $p<0,05$ respecto a pacientes sin EHM ($2,3\pm 0,3\%$) (Figura 19). Por lo tanto concluimos que existe una activación general de linfocitos T exclusiva en los pacientes con EHM.

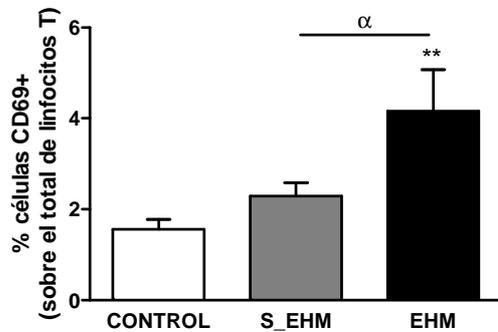


Figura 19. Porcentaje de células CD69+ sobre el total de linfocitos T. El * representa diferencias significativas entre pacientes y controles (** $p<0,01$) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). α $p<0,05$.

2.4.1.1. Linfocitos *helper* CD4

➤ Población

Para estudiar más a fondo la población de los CD4, miramos la distribución de los linfocitos *naive* hasta los de memoria, según van perdiendo la proteína de membrana CD45RA y van adquiriendo el CD45RO. En primer lugar vimos una disminución del porcentaje de los CD4 *naive* de los pacientes, tanto sin EHM como con EHM, comparado con los controles, bajando desde aproximadamente un 30% hasta un 21% en ambos grupos ($p<0,05$).

En paralelo, observamos un aumento en la población de linfocitos CD4 memoria subiendo desde un $55,7\pm 3,3\%$ en controles hasta un $66,4\pm 2,1\%$, $p<0,05$ y $68,9\pm 2,5\%$, $p<0,01$ en pacientes sin EHM y con EHM, respectivamente (Figura 20A y 20B).

Por lo tanto vemos un desplazamiento desde la población de linfocitos CD4 *naive* hasta la población de memoria, la cual se ha activado tras una respuesta inmune, en pacientes cirróticos.

Al ver que existe un cambio en los pacientes cirróticos en las poblaciones de linfocitos CD4 de memoria, estudiamos también los diferentes tipos de linfocitos de memoria que existen, por una parte los de memoria central (CCR7+CD62L+) y por otra los de memoria efectora (CCR7-CD62L-). No observamos ningún cambio en la distribución de los linfocitos de ambos tipos de memoria en pacientes respecto controles. Se mantiene un porcentaje de aproximadamente el 40% de linfocitos CD4 de memoria central y un 15% de linfocitos de memoria efectora respecto al total de los CD4 en todos los grupos experimentales (Figura 20C).

Por último, estudiamos la población de linfocitos CD4 con o sin la proteína de membrana CD28. A los linfocitos CD4 negativos para CD28 los llamamos linfocitos autoreactivos, ya que tienen la capacidad de activarse sin una molécula coestimuladora que desencadene la activación de la célula tras la unión del linfocito con una célula presentadora de antígeno mediante las proteínas CD28 y CD3. En este caso, observamos que, de forma exclusiva en los pacientes con EHM, existe un aumento significativo de la población llamada autoreactiva de CD4+CD28- sobre el total de CD4. Observamos que en pacientes con EHM existe un $38,9\pm 6,2\%$ ($p<0,05$ respecto a controles y a pacientes sin EHM) de las células CD4+ que son negativas para CD28 en comparación con un $15,6\pm 3,9\%$ en controles y un $22,4\pm 3,5\%$ en pacientes sin EHM. En concordancia, existe una disminución significativa ($p<0,05$) exclusiva en los pacientes con EHM respecto a los controles y a los pacientes sin EHM en la población de CD4 que son CD28+, que constituyen un 80-90% de la población de CD4 en individuos controles sanos (Figura 20D).

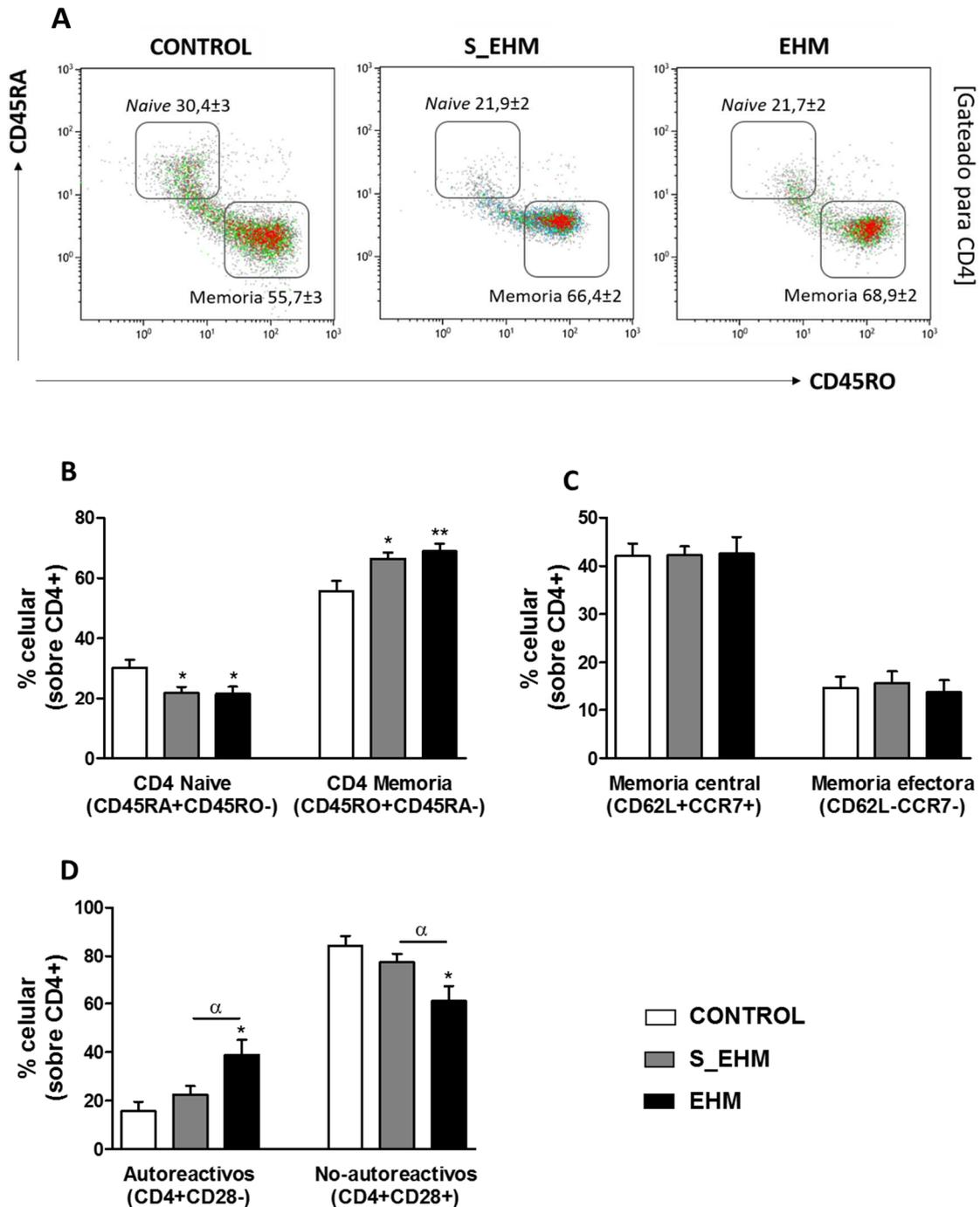


Figura 20. Población de linfocitos *helper* CD4. A. Imagen de citometría de las poblaciones *naive* y de memoria (en función de la expresión de CD45RA y CD45RO) acotado para los CD4 totales. Los datos se expresan en porcentajes de media±EEM de cada población en cada grupo experimental. B. Porcentaje celular de los linfocitos CD4 *naive* y de memoria sobre el total de los CD4. C. Porcentaje celular de los linfocitos CD4 de memoria central y efectora sobre el total de los CD4. D. Porcentaje celular de los linfocitos CD4 autoreactivos y no autoreactivos (CD28-/+) sobre el total de los CD4. El * representa diferencias significativas entre pacientes y controles (*p<0,05; **p<0,01) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). (α p<0,05).

➤ Activación

Medimos la activación de la población de linfocitos T CD4 con el marcador de activación temprana CD69. Observamos que el porcentaje de células positivas para CD69, dentro de la población de CD4 totales, está aumentado de forma selectiva en los pacientes con EHM ($2,2 \pm 0,6\%$, $p < 0,05$ respecto a controles ($1 \pm 0,2\%$) y $p < 0,05$ respecto a pacientes sin EHM ($1,1 \pm 0,2\%$) (Figura 21). Por lo tanto, concluimos que existe una activación general de linfocitos T *helper* exclusiva en los pacientes con EHM.

Para atender a cada una de las poblaciones de CD4 estudiadas, analizamos el porcentaje de células CD69+ para cada una de las poblaciones y vimos que a excepción de la población de linfocitos CD4 de memoria efectora, donde no se observa ningún cambio en el porcentaje de células positivas para CD69, en todas las demás poblaciones de CD4 estudiadas, vemos un aumento significativo del porcentaje del marcador de activación CD69 de manera selectiva en los pacientes con EHM. De esta manera, vemos que tanto en la población de CD4 *naive* como en la de memoria, de memoria central, los CD4+CD28- y los CD4+CD28+ observamos un aumento de prácticamente el doble en el porcentaje de células CD69+ respecto a los controles y los pacientes sin EHM, que no muestran ninguna diferencia con la población control (ver Figura 21).

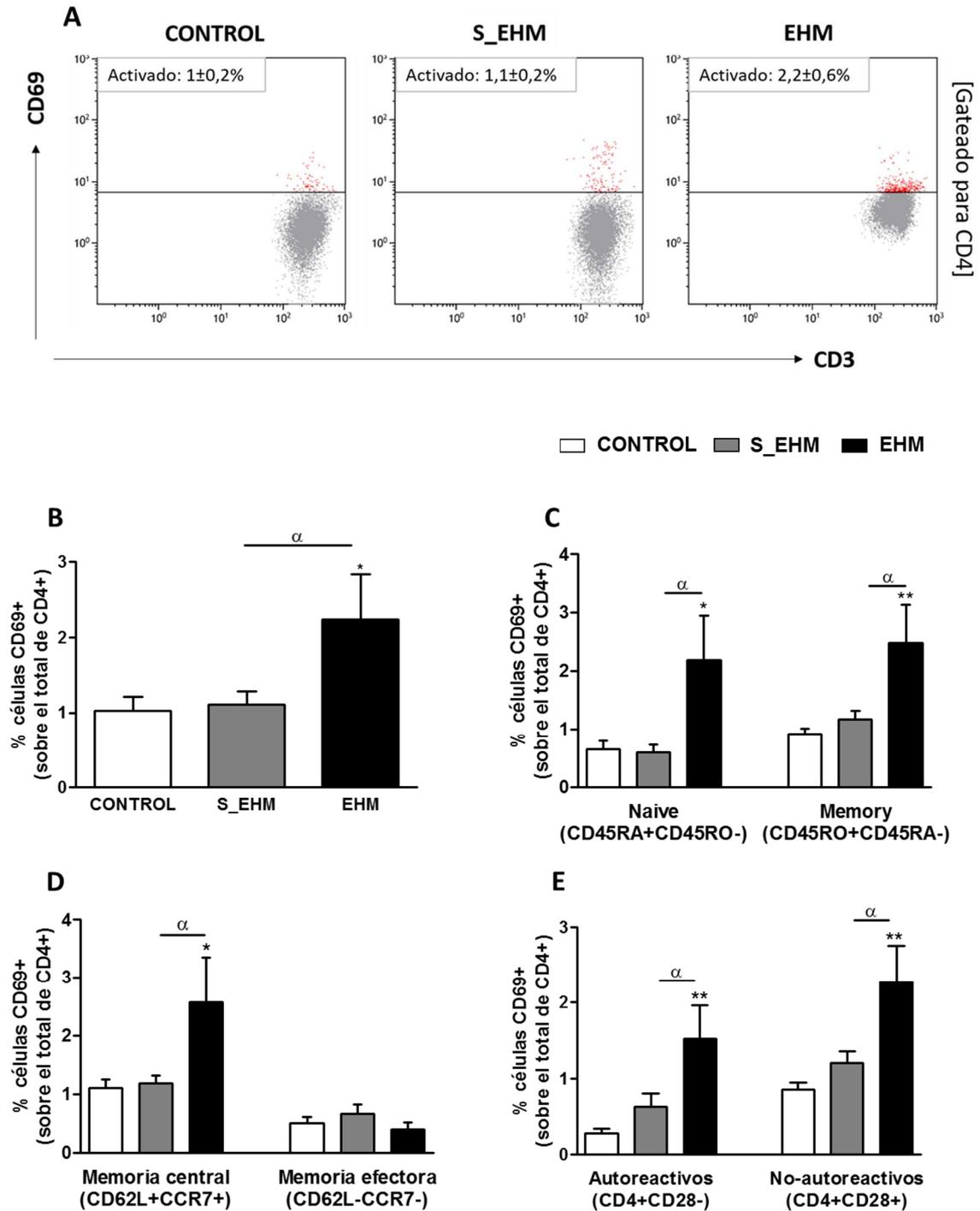


Figura 21. Activación de linfocitos *helper* CD4. **A.** Imagen de citometría de las células CD69+ acotado para los CD4 totales. Los datos se expresan en porcentajes de media±EEM de la población activada en cada grupo experimental. **B.** Porcentaje celular de los linfocitos CD69+CD4+ acotado sobre los CD4 totales. **C.** Porcentaje celular de los linfocitos CD69+CD4+ *naive* y de memoria acotado sobre los CD4 totales. **D.** Porcentaje celular de los linfocitos CD69+CD4+ de memoria central y efectora acotado sobre los CD4 totales. **E.** Porcentaje celular de los linfocitos CD69+CD4+ autoreactivos y no autoreactivos acotado sobre los CD4 totales. El * representa diferencias significativas ente pacientes y controles (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). ($\alpha p < 0,05$).

2.4.1.2. Linfocitos citotóxicos CD8

➤ Población

Para estudiar población de los CD8 citotóxicos, medimos los mismos parámetros medidos en la población de CD4 y vimos los resultados descritos a continuación.

En primer lugar, no vimos ningún cambio en los porcentajes de los CD8 *naive* ni de memoria en los pacientes respecto a los con los controles, manteniéndose en todos los casos en un porcentaje alrededor del 47%, aproximadamente, en el caso de los CD8 *naive* y del 30% en los de memoria en todos los grupos experimentales. Por lo tanto, no existe el desplazamiento hacia la adquisición de CD45RO en estas poblaciones como habíamos observado en el caso de los linfocitos CD4 (ver Figura 22A y 22B).

En concordancia con este dato, no observamos ningún cambio en la distribución de los linfocitos de memoria, ni en memoria central ni en memoria efectora. Se mantiene un porcentaje de aproximadamente el 15% de linfocitos CD8 de memoria central y un 40% de linfocitos de memoria efectora respecto al total de los CD8 tanto en controles como en ambos tipos de pacientes (Figura 22C).

Estudiamos, también, la población de linfocitos CD8 con o sin el receptor de membrana CD28. A los linfocitos CD8+CD28- los llamamos linfocitos T supresores, y se incluyen dentro de los linfocitos T con función reguladora, en vez de citotóxica, como la mayoría de CD8.

En este caso, observamos que en los pacientes sin EHM existe un aumento significativo de la población supresora CD8+CD28- sobre el total de CD4 ($60,8 \pm 4,5\%$, $p < 0,05$ respecto a los controles que muestran un $38 \pm 7,8\%$). En el caso de los pacientes con EHM la diferencia es incluso mayor mostrando un porcentaje del $77,3 \pm 4,7\%$ con una $p < 0,001$ respecto a los controles y una $p < 0,05$ respecto a los pacientes con EHM (Figura 22C).

En paralelo, existe una disminución significativa de la población no supresora en los pacientes sin EHM ($39,2 \pm 4,5\%$, $p < 0,05$) respecto a los controles ($57,4 \pm 8,3\%$) y una disminución aún mayor en pacientes con EHM mostrando un porcentaje del $22,7 \pm 4,7\%$ con $p < 0,001$ respecto a controles y $p < 0,05$ respecto a pacientes sin EHM (Figura 22D).

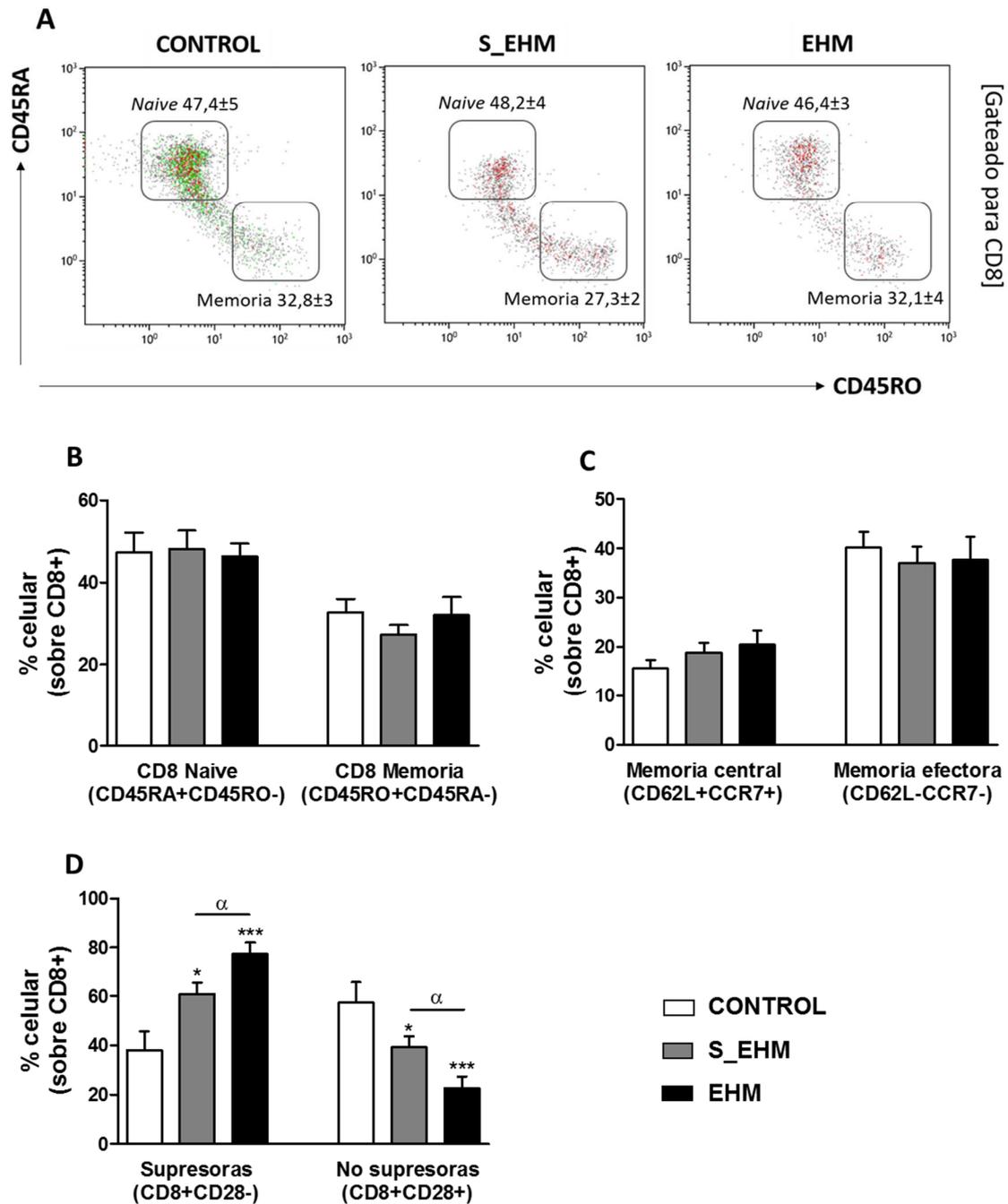


Figura 22. Población de linfocitos citotóxicos CD8. **A.** Imagen de citometría de las poblaciones *naive* y de memoria (en función de la expresión de CD45RA y CD45RO) acotado para los CD8 totales. Los datos se expresan en porcentajes de media±EEM de cada población en cada grupo experimental. **B.** Porcentaje celular de los linfocitos CD8 *naive* y de memoria sobre el total de los CD8. **C.** Porcentaje celular de los linfocitos CD8 de memoria central y efectora sobre el total de los CD8. **D.** Porcentaje celular de los linfocitos CD8 supresores y no supresores (CD28-/+) sobre el total de los CD8. El * representa diferencias significativas entre pacientes y controles (* $p < 0,05$; *** $p < 0,01$) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). ($\alpha p < 0,05$).

➤ Activación

Medimos la activación de la población de linfocitos T CD8 con el marcador de activación temprana CD69. Observamos que el porcentaje de células positivas para CD69, dentro de la población de CD8 totales, está aumentada de la misma manera en pacientes con y sin EHM respecto al control.

Después, analizamos el porcentaje de células CD69+ para cada una de las poblaciones de CD8 estudiadas y vimos que las CD8 *naive* presentaban un porcentaje de activación mayor en los dos tipos de pacientes por igual, $5,2 \pm 1\%$ ($p < 0,01$) y $5,7 \pm 1,3\%$ ($p < 0,01$) sin EHM y con EHM, respectivamente, frente al control con un valor de $1,7 \pm 0,3\%$ (ver Figura 23C). Sin embargo, los CD8 de memoria no presentaban ningún cambio en el porcentaje de células CD69+ en ninguno de los tres grupos de estudio (Figura 23C).

Esta ausencia de cambio en el marcador de activación la vemos también en los dos tipos de linfocitos CD8 de memoria, tanto central como efectora (Figura 23D).

Por último, miramos la activación de las células supresoras CD8+CD28- y observamos que presentaban un aumento en el porcentaje de células CD69+ en los dos grupos de pacientes, sin diferenciarse entre ellos ($4,3 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$ y $4,5 \pm 1\%$, $p < 0,01$ sin y con EHM, respectivamente, frente al control con un valor de $1,9 \pm 0,2\%$) (ver Figura 23E). Lo mismo ocurre con el dato e activación de las CD8+CD28+ ($3,1 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$ y $3,0 \pm 0,8\%$, $p < 0,01$ sin y con EHM, respectivamente, frente al control con un valor de $1,6 \pm 0,3\%$) donde volvemos a ver un porcentaje mayor en ambos tipos de pacientes con respecto al control.

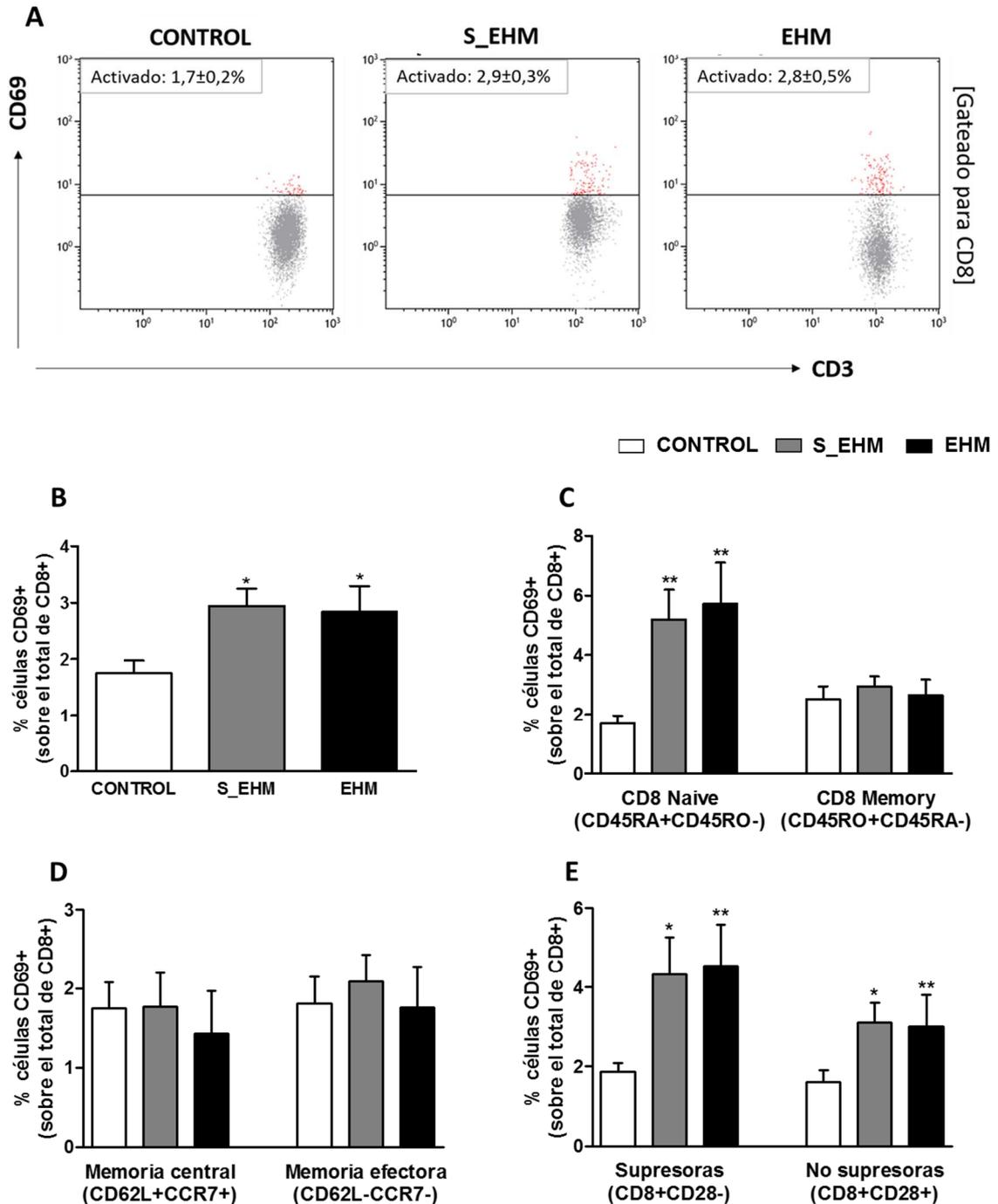


Figura 23. Activación de linfocitos citotóxicos CD8. A. Imagen de citometría de las células CD69+ acotado para los CD8 totales. Los datos se expresan en porcentajes de media±EEM de la población activada en cada grupo experimental. B. Porcentaje celular de los linfocitos CD69+CD8+ acotado sobre los CD8 totales. C. Porcentaje celular de los linfocitos CD69+CD8+ naive y de memoria acotado sobre los CD8 totales. D. Porcentaje celular de los linfocitos CD69+CD8+ de memoria central y efectora acotado sobre los CD8 totales. E. Porcentaje celular de los linfocitos CD69+CD8+ supresores y no supresores acotado sobre los CD8 totales. El * representa diferencias significativas ente pacientes y controles (* $p<0,05$; ** $p<0,01$). S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima).

2.4.2. Linfocitos B

➤ Población

Como ya se describe en el apartado 2.1 y 2.2 la población de linfocitos B esta disminuida en pacientes respecto a controles pero mantiene la misma proporción dentro del total de leucocitos.

➤ Activación

De la misma manera que con los monocitos y linfocitos T, medimos la activación con la proporción de células positivas para CD69. Vimos que los pacientes con EHM, de forma selectiva, tienen una activación mayor que los pacientes sin EHM y los controles presentando un porcentaje del $0,32 \pm 0,04\%$, $p < 0,05$ respecto al grupos S_EHM que tienen un $0,18 \pm 0,03\%$ y $p < 0,05$ respecto a los controles que presentan un $0,19 \pm 0,03\%$ de activación (Figura 23A).

En concordancia con este dato, vimos que hay una mayor cantidad de IgG en plasma de pacientes con EHM que en pacientes sin EHM y que en controles. Las inmunoglobulinas son el principal producto de los linfocitos B activados, por lo que medimos la cantidad de IgG presente en el plasma, tanto la cadena ligera de 25KDa, como la cadena pesada de 50KDa y en ambos casos vimos un aumento exclusivo en los pacientes con EHM. Un aumento del $171 \pm 16\%$ ($p < 0,001$) sobre los controles en el caso de la cadena ligera y un aumento del $155 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) sobre los controles en el caso de la cadena pesada. En el caso de pacientes cirróticos sin EHM no vimos ningún cambio significativo respecto al control (ver Figura 23B).

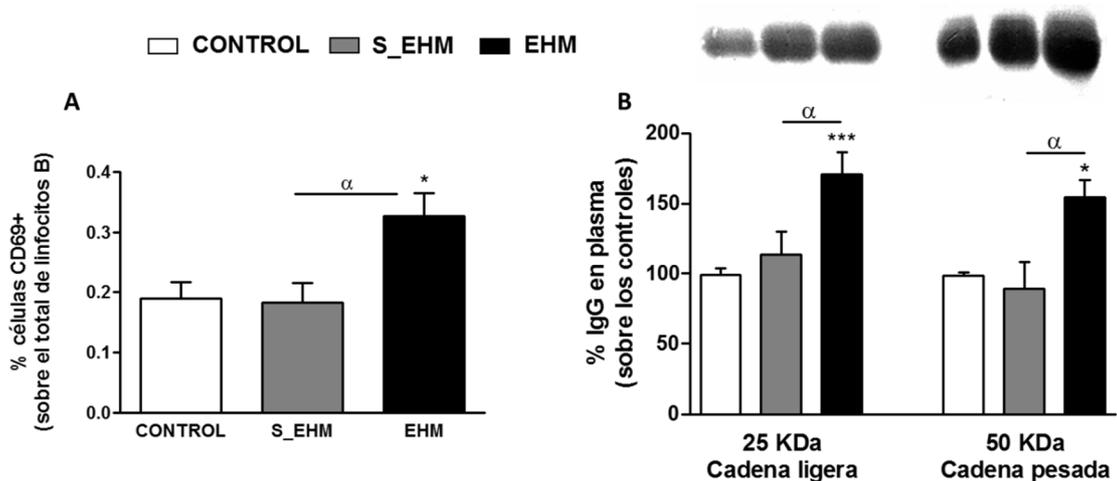


Figura 23. Activación de linfocitos B. A. Porcentaje celular de los linfocitos B CD69+ acotado sobre los linfocitos B totales (CD19+). B. Nivel de IgG en plasma, tanto la cadena ligera como la cadena pesada de la inmunoglobulina. Imagen de western blot encima de la gráfica. El * representa diferencias significativas ente pacientes y controles ($*p < 0,05$; $***p < 0,001$) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). ($\alpha p < 0,05$).

2.3. Estudio de la diferenciación de los distintos subtipos de linfocitos CD4

Los linfocitos *helper* CD4 parecen presentar cambios en su fenotipo de manera exclusiva en los pacientes con EHM, por lo que decidimos estudiarlos más a fondo.

Como ya hemos explicado en la introducción (apartado 3.2.2.1), los linfocitos CD4 se pueden diferenciar a distintos subtipos caracterizados por la expresión de factores de transcripción característicos y por la producción de ciertas interleucinas.

2.3.1. Estudio de los factores de transcripción

Estudiamos la expresión del RNA mensajero de los distintos factores de transcripción característicos de los diferentes subtipos de CD4 en las PBMC y observamos que el factor AHR (característico de los TH22) y el BCL6 (característico de los Tfh) están aumentados de manera significativa y selectiva en los pacientes con EHM, respecto al control y al resto de pacientes sin EHM. Vemos un aumento del $2,1\pm 0,4$ ($p<0,01$) sobre el control en la expresión de AHR y un aumento de $1,4\pm 0,1$ ($p<0,01$) sobre el control en el caso del factor BCL6. Los controles están representados por el valor 1. Con ello, asumimos que estos dos subtipos celulares podrían estar aumentados en pacientes con EHM, respecto al total de CD4, es decir, que la diferenciación de los T *helpers* estaría siendo favorecida hacia los linfocitos Th22 y Tfh.

En el caso de FoxP3 y GATA3 vemos una disminución significativa ($p<0,05$) en los dos tipos de pacientes respecto del control, lo que se correspondería con una disminución de los linfocitos de función antiinflamatoria, las T reguladoras y las TH2, respectivamente.

Por último, no observamos ningún cambio en la expresión de RORC (característico de las TH17) ni en TBX21 (característico de las TH1), por lo que suponemos que la diferenciación de estos tipos celulares no se está viendo afectada en ninguno de los dos tipos de pacientes cirróticos (ver Figura 24 para todos los factores de transcripción).

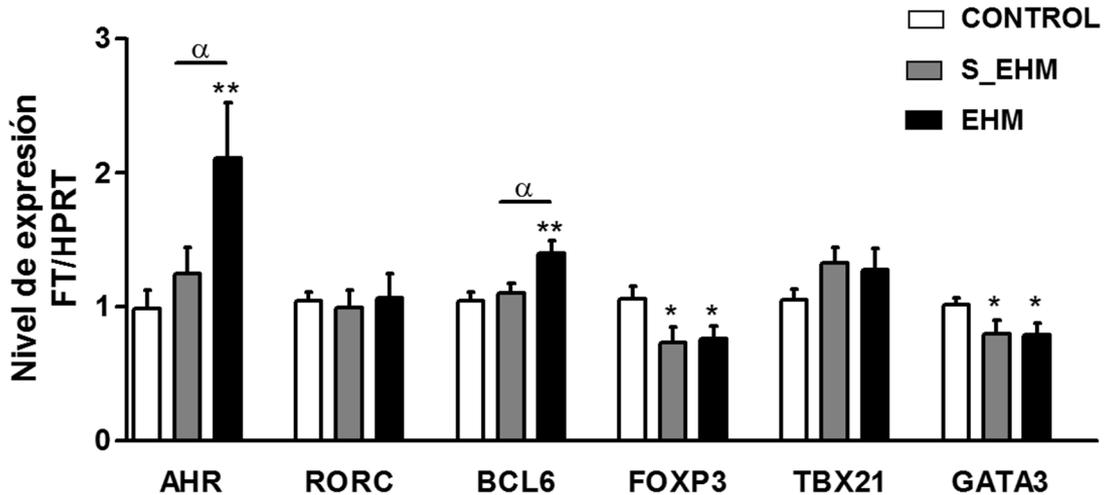


Figura 24. Nivel de expresión de los distintos factores de transcripción característicos de los las distintas subpoblaciones de linfocitos CD4. FT, factor de transcripción. HPRT, como gen endógeno normalizador. Controles=1. El * representa diferencias significativas ente pacientes y controles (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). (α $p < 0,05$).

2.3.2. Estudio de la secreción de citocinas *in vitro*

Para este estudio, aislamos las células CD4+ del total de células mononucleares de sangre y las cultivamos (tal como se explica en material y métodos) para estudiar las citocinas que secretan los CD4 al sobrenadante, con el fin de caracterizar los subtipos celulares presentes en nuestros pacientes.

Lo que observamos es que en los casos en los que no añadimos coestimulador (CD28 y CD3), ya vemos un aumento en la presencia de ciertas citocinas en el sobrenadante de pacientes con EHM respecto a controles y a pacientes sin EHM, donde no observamos ninguna diferencia. En el caso de las IL-21 y el TNF α , solo vemos una tendencia de incremento, que se convierte en un aumento significativo en el caso de la IL-17 y las IL-22 (Figura 25).

Cuando le añadimos el coestimulador, vemos en todas la interleucinas analizadas en este experimento un aumento significativo en los pacientes con EHM respecto al control y respecto a los pacientes sin EHM, que aún con coestimulación siguen sin mostrar ninguna diferencia con respecto al control. Sabemos que el tiempo de estimulación del experimento, 6 horas, es suficiente para que se exprese el mRNA de las interleucinas en linfocitos sanos, pero no lo es para que se traduzcan y se secreten al medio. Por esta razón, ni en linfocitos de pacientes sin EHM ni en controles vemos la diferencia entre las muestras sin CD28 y las muestras con CD28 añadido exógenamente. Sin embargo, en pacientes con EHM vemos que la secreción

es mucho mayor y más aún, cuando añadimos el coestimulador. Podemos presuponer que estos linfocitos, más concretamente refiriéndonos a los Th17, Th21 y Th22, ya están activados en sangre (como hemos visto con el aumento selectivo del CD69 en linfocitos de pacientes con EHM) y por ello ya tienen las interleucinas sintetizadas para secretarlas incluso antes de añadir el estímulo externo.

Además, las células CD4+CD28-, que también hemos visto que están aumentadas en pacientes con EHM, al tener una capacidad de activación innata, no necesitan la presentación de ningún antígeno ni la unión a su CD28, ya que carecen de él y son capaces de secretar ciertas interleucinas como la IL-17 (Pieper et al., 2014). Este tipo celular, por tanto, podría explicar un aumento en la IL-17 en ausencia del coestimulador CD28.

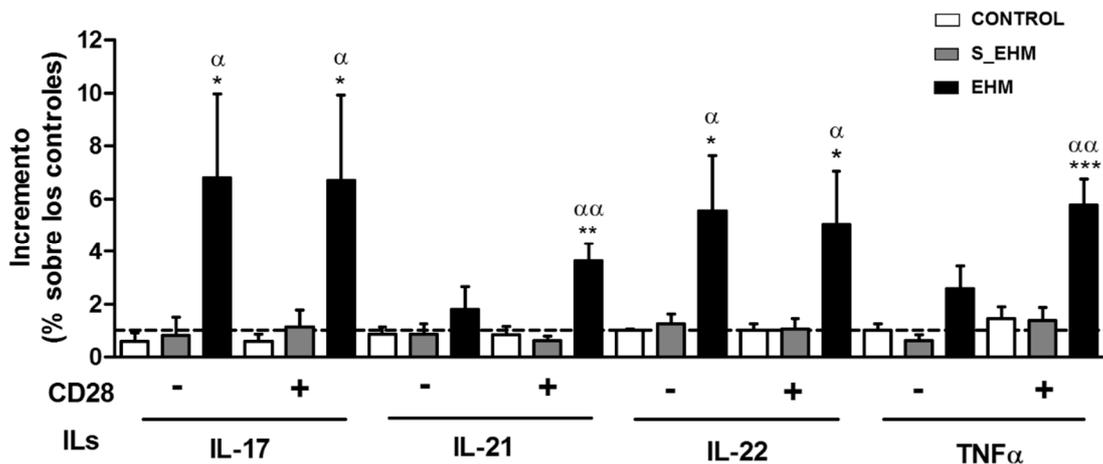


Figura 25. Nivel de interleucinas en sobrenadante de cultivo de celular de linfocitos CD4 aislados en presencia o ausencia del activador CD28. (-ausencia / + presencia). El * representa diferencias significativas ente pacientes y controles (valor=1). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). (α $p < 0,05$; $\alpha\alpha$ $p < 0,01$; $\alpha\alpha\alpha$ $p < 0,001$).

2.3.3. Estudio de las T reguladoras

Hicimos un estudio más exhaustivo de los linfocitos CD4 T reguladores ya que en muchas patologías se han relacionado con el deterioro cognitivo. Por una parte estudiamos el número de este subtipo celular en sangre mediante la identificación de los marcadores CD25 y CD127 (CD4+CD25^{high}CD127^{low}) y por otra parte, nos centramos en el factor de transcripción Foxp3 en linfocitos. Los resultados obtenidos nos indican un aumento en el porcentaje de las T reguladoras sobre el total de las CD4 en pacientes cirróticos respecto a los controles sanos, pero

sin diferencias entre con o sin EHM ($2,3\pm 0,2\%$, $p<0,01$ en pacientes sin EHM y $2,2\pm 0,2\%$, $p<0,05$ en pacientes con EHM, respecto al control que supone el $1,4\pm 0,1\%$; Figura 26A). Sin embargo, teniendo en cuenta la linfopenia en los pacientes cirróticos, el número total de células T reguladoras en sangre se ve disminuido respecto a los controles, pero de nuevo sin diferencias entre pacientes con o sin EHM ($7,3\pm 1\%$, $p<0,01$ en pacientes sin EHM y $8,5\pm 1,2\%$, $p<0,05$ en pacientes con EHM, respecto al control que supone el $14\pm 2,1\%$; Figura 26B). En cuanto al estudio del factor de transcripción FOXP3 en las T reguladoras, no vemos diferencias ni en el número de células T reguladoras positivas para FOXP3, ni en la intensidad de expresión del factor de transcripción en las T reguladoras medido mediante citometría (Figuras 26C y 26D).

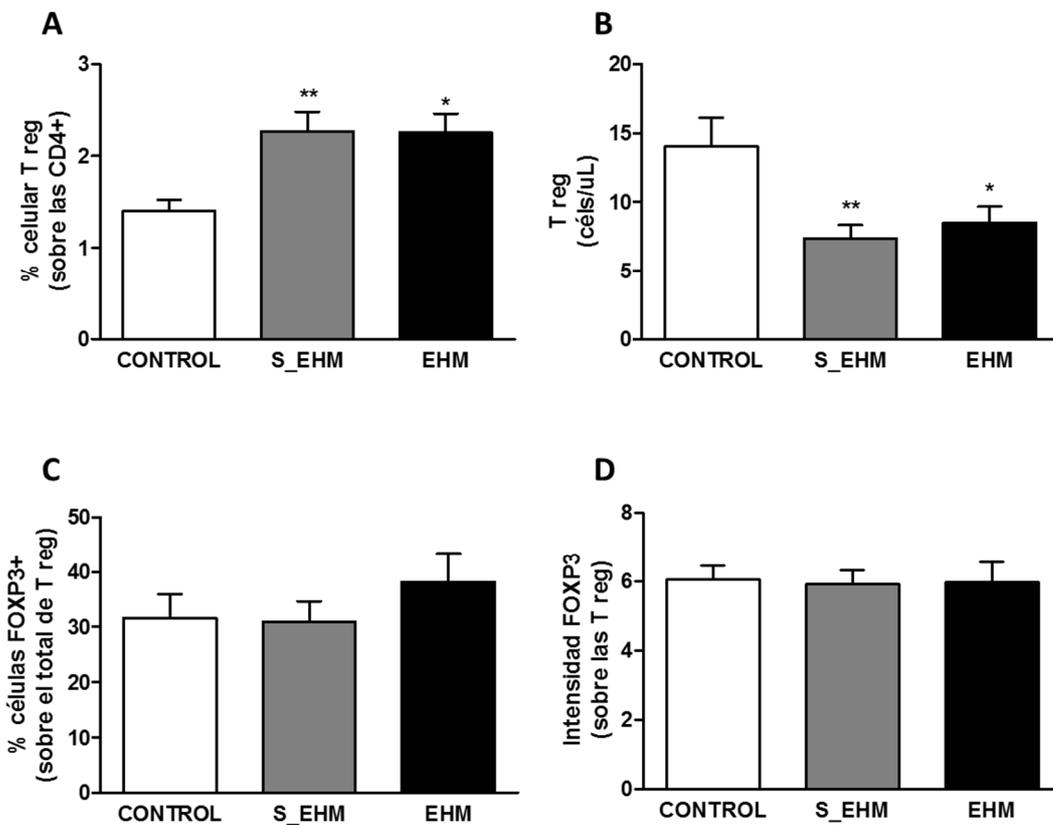


Figura 26. Estudio de las T reguladoras en sangre. **A.** Porcentaje de T reguladoras sobre el total de CD4. **B.** Número de células T reguladoras por microlitro en sangre. **C.** porcentaje de células FOXP3+ sobre el total de T reguladoras. **D.** Intensidad (en unidades de citometría) del factor de transcripción FOXP3 en las T reguladoras. El * representa diferencias significativas entre pacientes y controles (valor=1). ($*p<0,05$; $**p<0,01$). S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima).

3. Estudio de los niveles de citocinas en suero

Se realizó un estudio de un gran número de citocinas en suero para ver las diferencias entre los grupos experimentales. Lo observado fue que, por lo general todas las citocinas pro-inflamatorias están aumentadas en pacientes y el aumento es mayor o exclusivo en los pacientes con EHM en ciertas citocinas (Figura 27). A continuación comentamos cada una de ellas:

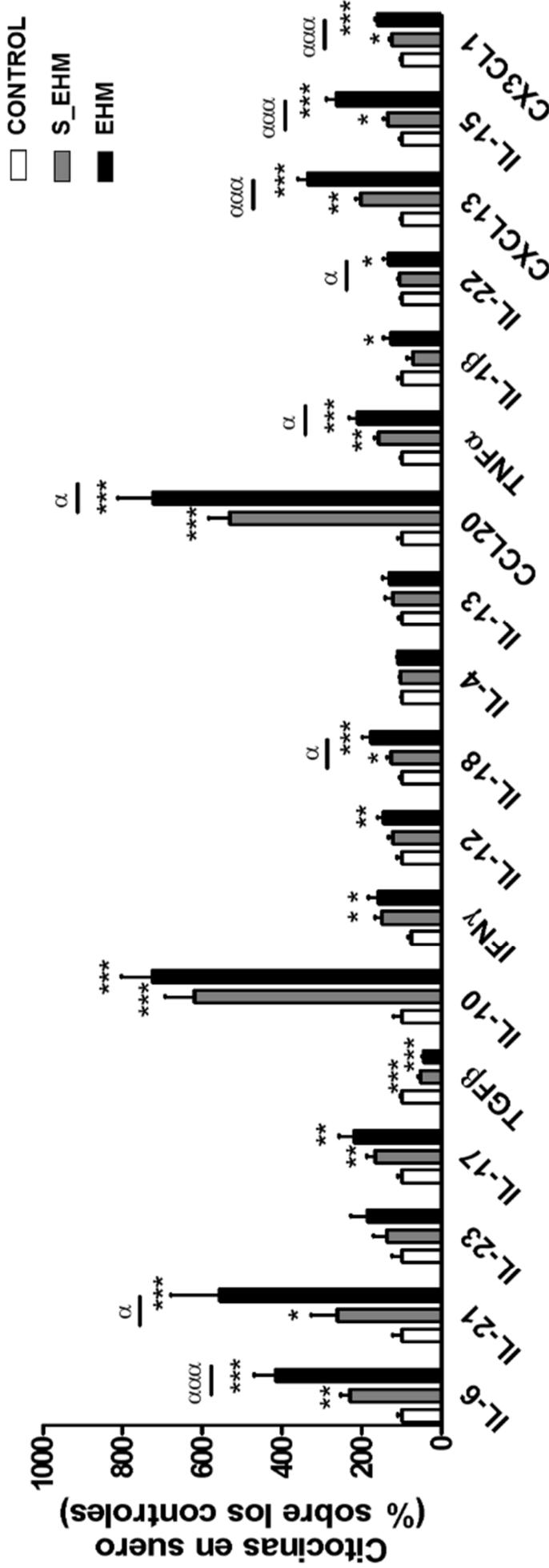
- La **IL-6** presenta un aumento significativo en los pacientes sin EHM del $231\pm 22\%$ ($p<0,01$) sobre los controles (que suponen el 100%) y un aumento aún mayor, del $416\pm 55\%$ ($p<0,001$) en los pacientes con EHM sobre los controles, mostrando también una diferencia significativa ($p<0,001$) entre ambos tipos de pacientes. La IL-6 puede ser producida, entre otros, por monocitos activados, que ya hemos visto que su porcentaje está aumentado en EHM (apartado 2.3) y también por linfocitos T (apartado 2.4.1). Tendría un efecto directo sobre su receptor en las células endoteliales (también en la BHE), promueve la diferenciación de los Th22, los Th17 y los Tfh y además induce las rutas de señalización del STAT3 y de la secreción del CCL20 desde las células endoteliales.
- La **IL-21** presenta un aumento significativo del $262\pm 66\%$ ($p<0,05$) en los pacientes sin EHM sobre los controles, y un aumento aún mayor, del $557\pm 122\%$ ($p<0,001$) en los pacientes con EHM sobre los controles, mostrando también una diferencia significativa ($p<0,05$) entre ambos tipos de pacientes. La IL-21 es producida, principalmente por los Tfh, aunque también la pueden producir los TH17 y su principal función es la activación de linfocitos B. Como hemos visto en el apartado anterior, los pacientes con EHM presentaban un porcentaje mayor de células B activadas (apartado 2.4.2) que concuerda con un aumento de IL-21 en suero. También, favorece la diferenciación de los mismos Tfh y de los Th17 e inhibe la diferenciación de las T reguladoras inducidas. Tiene un papel fundamental en la formación de centros germinales y el mantenimiento de los mismos y actúa como coestimuladora de la CXCL13 (que también vemos aumentada en pacientes con EHM).
- La **IL-23** presenta una tendencia no significativa de aumento en ambos tipos de pacientes respecto al control. $138\pm 34\%$ y $185\pm 43\%$ en pacientes sin y con EHM, respectivamente. Una función importante es la promoción de la diferenciación de los Th17.

- La **IL-17** presenta un aumento significativo en ambos grupos de pacientes respecto al control, pero no hay diferencias significativas entre ellos. Vemos un aumento de $168\pm 21\%$ ($p < 0,01$) en pacientes sin EHM y un $220\pm 37\%$ ($p < 0,01$) en pacientes con EHM. La producen, principalmente, los Th17 y tiene función proinflamatoria sobre varias células dianas, entre ellas las endoteliales de la BHE. Además, induce la liberación de CXCL13, implicada en la formación de centros germinales.
- El **TGF β** presenta una disminución significativa en ambos tipos de pacientes. Vemos un $55\pm 5\%$ ($p < 0,001$) sobre los controles, en los pacientes sin EHM y un $45\pm 5\%$ ($p < 0,001$), en los pacientes con EHM. No existe diferencia significativa entre los dos tipos de pacientes. El TGF β es una citocina antiinflamatoria, producida por las T reguladoras, entre otras células. En altas cantidades promueve la diferenciación de las T reguladoras y a bajas concentraciones, favorece la diferenciación de las Th17 e inhibe la diferenciación del FoxP3 (en el apartado 2.3.1 vemos una disminución de la expresión de FoxP3 en las CD4 en ambos tipos de pacientes).
- La **IL-10** presenta un gran aumento significativo en ambos grupos de pacientes respecto al control, pero no hay diferencias significativas entre ellos. Vemos un aumento de $321\pm 73\%$ ($p < 0,001$) en pacientes sin EHM y un $725\pm 79\%$ ($p < 0,001$) en pacientes con EHM. Aunque, por lo general, es una interleucina antiinflamatoria, es una proteína pleiotrópica con diversas funciones. Es producida por células de carácter antiinflamatorio, como los monocitos no clásicos y por las T reguladoras. En los primeros no vimos cambio en la distribución de la población de monocitos (ver apartado 2.3) y en las T reguladoras hemos visto una disminución de la expresión de FoxP3, su factor de transcripción. Por lo tanto, podemos achacar este gran aumento a los linfocitos B específicos productores de IL-10.
- El **INF γ** y la **IL-12** son dos citocinas producidas por monocitos proinflamatorios y linfocitos Th1 y a su vez promueven la diferenciación de estos Th1. En el INF γ vemos un aumento del 150% aproximadamente en ambos pacientes con una $p < 0,05$ sobre los controles. En la IL-12 solamente vemos un aumento significativo de $146\pm 14\%$ ($p < 0,01$) en los pacientes con EHM. No vemos cambios en los restantes grupos.
- La **IL-18** presenta un aumento significativo del $127\pm 11\%$ ($p < 0,05$) en los pacientes sin EHM sobre los controles, y un aumento aun mayor, del $178\pm 21\%$ ($p < 0,001$) en los pacientes con EHM sobre los controles, mostrando también una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre ambos tipos de pacientes. La producen monocitos pro inflamatorios (hemos visto que están aumentados en EHM) y tiene un efecto general proinflamatorio.

- La **IL-4** y la **IL-13** son dos interleucinas producidas por los Th2 y de carácter anti-inflamatorio. No vemos ningún cambio en estas citocinas.
- El **CCL20**, también llamado MIP-3 α , presenta un gran aumento significativo del 532 \pm 53% ($p<0,001$) en los pacientes sin EHM sobre los controles y un aumento aún mayor, del 723 \pm 88% ($p<0,001$) en los pacientes con EHM sobre los controles y ($p<0,05$) también sobre los pacientes sin EHM. Es producida, principalmente, por macrófagos proinflamatorios y por células endoteliales. Su secreción es inducida por la IL-6 y el TNF α y tiene función de quimioatracción de células que presentan su receptor CCR6, como las Th17 y las Th22. Por lo tanto, un gradiente de CCL20 en tejidos inflamados va a promover la migración de linfocitos proinflamatorios a ese lugar.
- El **TNF α** presenta un aumento significativo del 159 \pm 11% ($p<0,01$) en pacientes sin EHM respecto al control y del 212 \pm 21% ($p<0,001$) en pacientes con EHM respecto al control y ($p<0,05$) respecto a los pacientes sin EHM. El TNF α es producido por los monocitos activados y por los Th22 y a su vez, promueve la diferenciación de estos linfocitos. Concuerdan nuestros datos en los aumentos de estos dos tipos celulares. Además tiene receptores en células endoteliales, pudiendo provocar un efecto directo en la BHE.
- La IL-1 β muestra un aumento significativo solamente en el grupo de pacientes con EHM (127 \pm 18%, $p<0,05$) respecto a controles. La producen los monocitos activados y también tiene receptores en células endoteliales, pudiendo provocar un efecto directo a través de la BHE.
- La **IL-22** presenta un aumento selectivo en los pacientes con EHM (134 \pm 13, $p<0,05$ respecto al control y $p<0,05$ respecto a pacientes sin EHM). La producen principalmente los Th22 y también pueden producirla los Th17. Tiene un papel sinérgico con la IL-17 y el TNF α y participa en la liberación de CXCL13, implicada en la formación de centros germinales.
- **CXCL13** presenta un aumento significativo del 202 \pm 13% ($p<0,01$) en los pacientes sin EHM sobre los controles, y un aumento aún mayor, del 335 \pm 26% ($p<0,001$) en los pacientes con EHM sobre los controles, mostrando también una diferencia significativa ($p<0,001$) entre ambos tipos de pacientes. Su papel principal es la guía de linfocitos B hacia los centros germinales (explicado en detalle más adelante).
- **IL-15** presenta un aumento significativo del 136 \pm 10% ($p<0,05$) en los pacientes sin EHM sobre los controles, y un aumento aun mayor, del 265 \pm 26% ($p<0,001$) en pacientes con EHM sobre los controles, mostrando también una diferencia significativa ($p<0,001$)

entre ambos tipos de pacientes. La pueden producir astrocitos y macrófagos infiltrados y puede atraer y promover la migración de los CD4+CD28- a través de la BHE.

- **CX3CL1**, también llamada fractalkina. Presenta un aumento significativo del $125\pm 6\%$ ($p<0,01$) en los pacientes sin EHM sobre los controles, y un aumento aún mayor, del $160\pm 7\%$ ($p<0,001$) en paciente con EHM sobre los controles, mostrando también una diferencia significativa ($p<0,001$) entre ambos tipos de pacientes. Se expresa en células endoteliales activadas y su función principal es atraer a leucocitos con el receptor CX3CR1, como los linfocitos CD4+CD28-.



Controles (pg/mL)	IL-6	IL-21	IL-23	IL-17	TGFβ	IL-10	IFNγ	IL-12	IL-18	IL-4	IL-13	CCL20	TNFα	IL-1β	IL-22	CXCL13	IL-15	CX3CL1
Media	0.99	81.36	4.49	1.06	31240	0.89	1.27	0.72	138.8	1.65	1.79	11.15	1.44	6.54	58.5	60.42	3.30	530
EEM	0.11	18.24	1.13	0.12	1404	0.18	0.20	0.09	10.07	0.04	0.16	1.24	0.06	0.69	2.77	2.89	0.23	20

Figura 27. Nivel de distintas citocinas en suero. Valores expresados en porcentaje sobre los controles. En la Tabla bajo la gráfica podemos ver la concentración en pg/mL de todas las citocinas en los controles. El * representa diferencias significativas ente pacientes y controles (valor=100). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). (α $p < 0,05$; $\alpha\alpha\alpha$ $p < 0,001$).

4. Estudio del factor de transcripción STAT3 en PBMC

Cuando la IL-6, la IL-21 o la IL-22 se unen a sus receptores de membrana en linfocitos desencadenan una cascada de señalización que hace que se fosforile el factor de transcripción STAT3 y que se trasloque al núcleo promoviendo la síntesis de genes tales como BCL6, RORC o AHR en el caso de los linfocitos T CD4 o de genes implicados en la producción de inmunoglobulinas, en el caso de los linfocitos B.

En pacientes con EHM existe un aumento de la IL-6, la IL-21 y la IL-22 en suero y un aumento en el factor de transcripción BCL6 y AHR, aunque no en RORC, en las PBMC. Además, tienen un mayor contenido de IgG en plasma, producida por los linfocitos B. Para estudiar el factor responsable de estas rutas de activación, medimos la proteína STAT3. Observamos que en pacientes con EHM, la proteína STAT3, aunque no esté más aumentada en cantidad, sí que presentaba un mayor porcentaje de fosforilación respecto a controles y a pacientes sin EHM. Más de un 30% de la proteína STAT3 está fosforilada (activada) en pacientes con EHM, mientras que en controles no llega al 10% y los pacientes sin EHM no presentan diferencias significativas con el control (Figura 28A, 28B y 28C).

Para relacionar estos parámetros se hicieron correlaciones bivariadas con los posibles parámetros relacionados y observamos que los dos parámetros que nos daban correlaciones positivas significativas con el porcentaje de fosforilación de STAT3 fueron el factor de transcripción BCL6 y el ligando CXCL13, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,59 ($p < 0,01$) y 0,6 ($p < 0,001$), respectivamente (Figura 28D). Este resultado sugiere que la ruta donde vemos la activación de STAT3 no es la de la diferenciación de Th17, ni de los Th22, sino más bien la de los linfocitos foliculares y la secreción de CXCL13 en los folículos germinales.

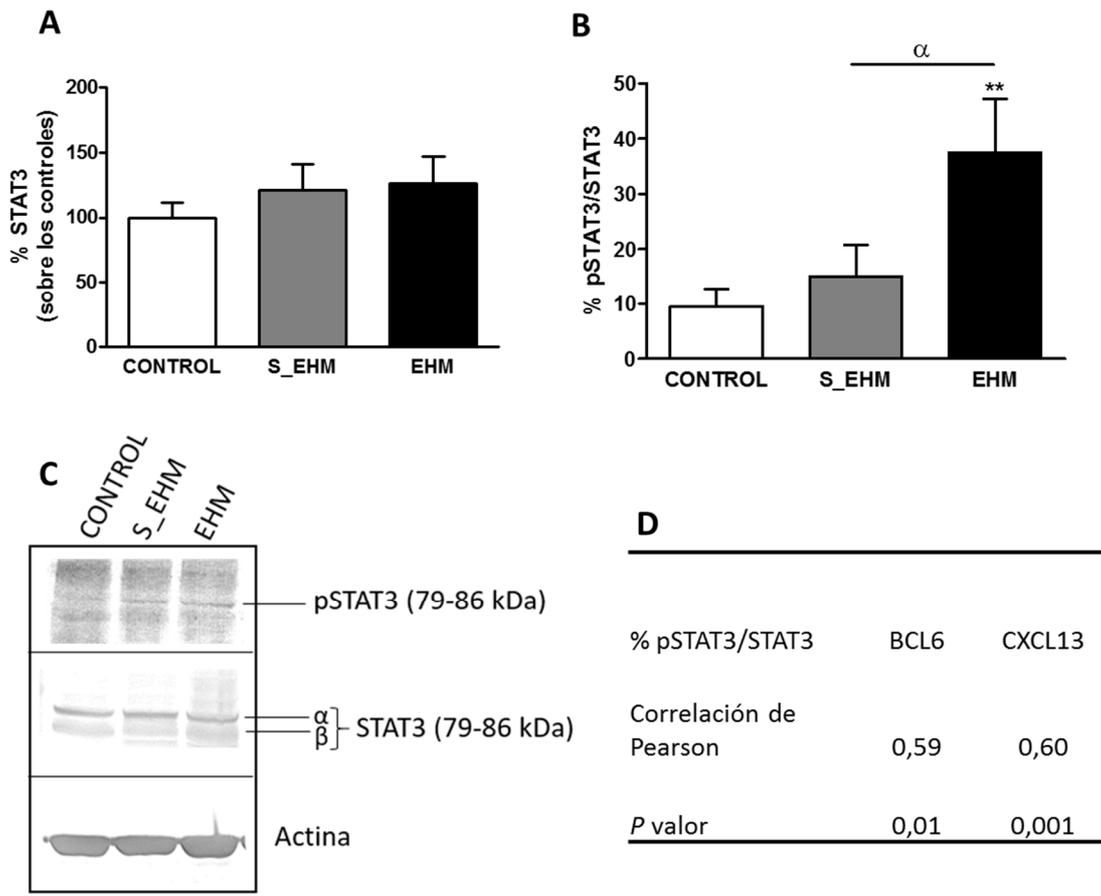


Figura 28. Estudio del factor de transcripción STAT3. **A.** Nivel de Stat3 en las PBMCs (porcentaje sobre los controles). **B.** Porcentaje de proteína fosforilada sobre la proteína total. El * representa diferencias significativas entre pacientes y controles. (** $p < 0,01$) y el α representa diferencias entre S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima). (α $p < 0,05$). **C.** Imagen de western blott de la proteína Stat3 fosforilada y Stat3 total. **D.** Tabla de correlación de Pearson entre la proteína Stat3 fosforilada y el factor de transcripción BCL6 y la citocina CXCL13.

5. Estudio de la metalopeptidasa MMP9 en plasma

MMP9 (Matriz Metalopeptidasa 9) es una clase de enzima que pertenece a la familia de zinc-metaloproteinasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular. Es secretada por linfocitos y monocitos y su producción es inducida por factores como el TNF α . La mayoría de las MMPs se secretan como pro-proteínas inactivas que se activan cuando se escinden por proteinasas extracelulares. La enzima codificada por este gen degrada colágenos y otras proteínas de la matriz extracelular.

MMP9, junto con elastasas, parece ser un factor regulador en la migración de neutrófilos a través de la membrana basal. Además, juega un papel importante en la activación de células del sistema inmune, degradando matriz extracelular, activando la IL-1 β y ayudando a la liberación de varias quimiocinas.

Medimos esta proteína en plasma de pacientes y controles y observamos que en los pacientes con EHM, la pro-MMP9 liberada a plasma presenta un aumento del 133 \pm 12% ($p < 0,05$) sobre los controles (100%) y sobre los pacientes sin EHM ($p < 0,05$) que no presentan cambios respecto al control.

Sin embargo, en el caso del péptido activo, no encontramos ninguna diferencia entre los tres grupos de estudio, por lo que suponemos que la forma activa se ha degradado o no detectamos su aumento.

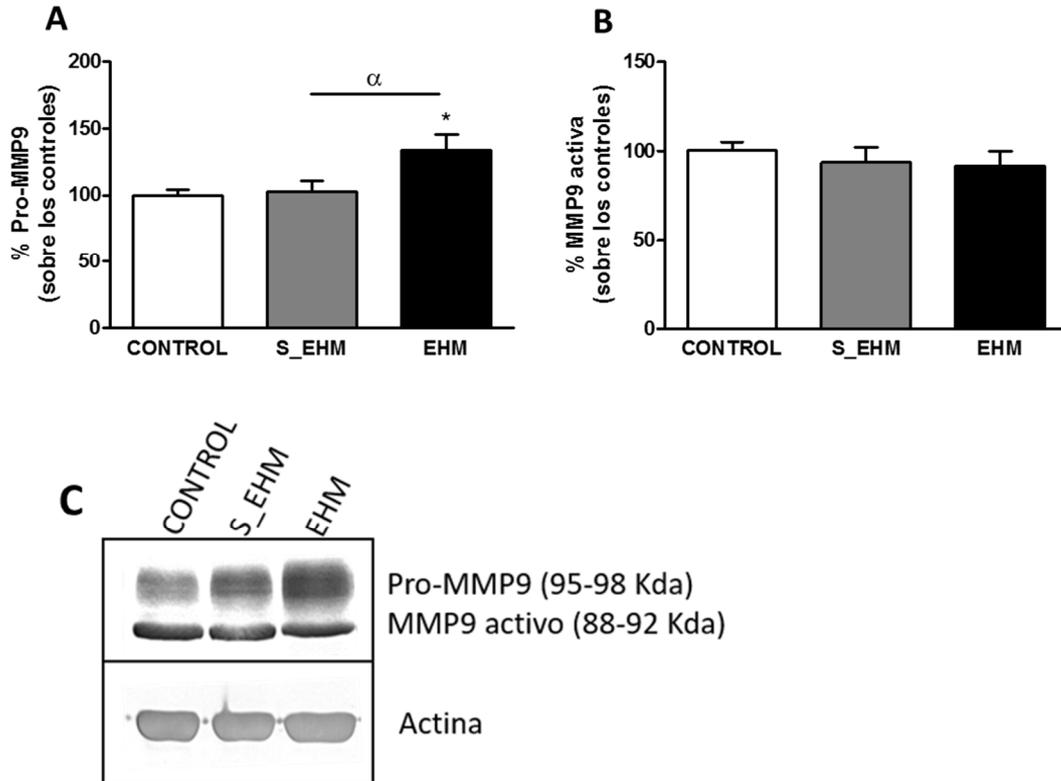


Figura 29. Estudio de la metalopeptidasa MMP9. **A.** Nivel de la proteína precursora de MMP9 en plasma (porcentaje sobre los controles). El * representa diferencias significativas entre pacientes y controles. (* $p < 0,05$). **B.** Porcentaje del péptido activo del MMP9. **C.** Imagen de western blott de la proteína MMP9 (precursor y péptido activo). S_EHM (sin encefalopatía hepática mínima) y EHM (con encefalopatía hepática mínima)

6. Estudio del antígeno leucocitario humano (HLA) en sangre total.

En la Tabla 14 resumimos los genes pertenecientes a subunidades del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) clase I o clase II en los que se ha encontrado una alteración. El análisis se llevó a cabo mediante transcriptómica a partir de sangre total, como explicamos en el apartado 11 de Material y Métodos.

En la Tabla 14 podemos observar que los isotipos HLA-DPB2 y HLA-DRB5 pertenecientes al complejo MHC clase II (unión a los CD4) tienen un nivel de expresión disminuido en los pacientes con EHM respecto a los controles y respecto a los pacientes sin EHM. Estos últimos, no presentan cambios respecto al control. Esto podría estar afectando a la activación de los CD4 por parte de los leucocitos propios de los pacientes con EHM, ya que al estar disminuida la expresión de los antígenos leucocitarios humanos, el sistema inmune no va a ser capaz de distinguir lo propio de lo ajeno pudiendo atacar a las células del propio individuo. Esto es, precisamente, lo que ocurre en los procesos de autoinmunidad.

En el caso de los isotipos perteneciente al MHC clase I, vemos que el decremento de la expresión es detectado tanto en pacientes con EHM, como sin EHM (excepto en el HLA-F) y no vemos diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, solo respecto al control. Podemos presuponer que los linfocitos que se activan uniéndose al MHC clase I, los citotóxicos CD8+, pueden activarse por células propias del sistema inmune, siendo incapaz de reconocerlas como propias. Así, tanto en pacientes sin o con EHM vemos una posible activación autoinmune en los linfocitos CD8.

Estos datos coinciden con la activación vista con el marcador CD69 tanto en linfocitos CD4 como en CD8. En el caso de los CD4 vemos una activación mayor exclusiva de los pacientes con EHM (al igual que la disminución de isotipos de MHC clase II), mientras que en el caso del marcador CD69 en los CD8, vemos un aumento en ambos tipos de pacientes sin diferencias entre ellos, al igual que en la disminución de la expresión de MHC clase I.

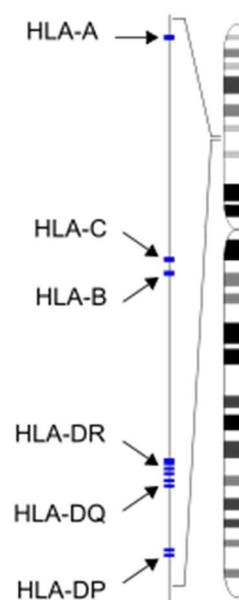


Figura 30. Esquema del gen que codifica para el HLA.

Tabla 14. Análisis de los diferentes isotipos del complejo de HLA. Estudio de transcriptómica en sangre total.

	S_EHM vs. CRT		EHM vs. CRT		EHM vs. S_EHM	
	Incremento	<i>p</i> valor	Incremento	<i>p</i> valor	Incremento	<i>p</i> valor
MHC clase II						
HLA-DPB2	-	ns	-0,840	0,008	-0,778	0,009
HLA-DRB5	-	ns	-0,828	0,041	-0,898	0,021
MHC clase I						
HLA-C	-0,546	0,022	-0,479	0,041	-	Ns
HLA-G	-0,408	0,030	-0,467	0,015	-	Ns
HLA-H	-0,609	0,024	-0,520	0,049	-	Ns
HLA-J	-0,561	0,029	-0,648	0,014	-	Ns
HLA-F	-	ns	-0,900	0,002	-	Ns

ns: no significativo. Incremento respecto al control=1

7. Estudio de la capacidad predictiva de parámetros estudiados en el diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima

7.1. Correlación entre los diferentes parámetros estudiados y las alteraciones cognitivas y motoras de los pacientes con EHM

Se realizó un estudio de correlaciones bivariadas entre los diferentes parámetros analizados y los resultados de los test que evalúan las capacidades cognitivas y motoras en los pacientes estudiados.

7.1.1. Alteraciones cognitivas

Atención selectiva: en la Tabla 15 se muestran los coeficientes de correlación estadísticamente significativos entre los parámetros estudiados y los resultados de los test utilizados para evaluar la atención selectiva, el Stroop y el test de claves oral.

Como observamos en la Tabla 15, existen correlaciones entre los niveles de interleucinas en suero o las alteraciones leucocitarias con el deterioro de la capacidad de atención de los pacientes. Observamos que hay correlaciones con coeficiente negativo entre la mayoría de las interleucinas y citocinas proinflamatorias y el número de ítems o aciertos de los diferentes test. Por el contrario, existe una correlación con coeficiente positivo entre la concentración de TGF β , citocina antiinflamatoria, en suero y el número de ítems o aciertos de los diferentes test. Por lo tanto, un ambiente proinflamatorio y la falta de componentes antiinflamatorios, está relacionada con los déficits de atención en estos pacientes.

Por otra parte, la disminución en el número de leucocitos en sangre correlaciona positivamente con el número de aciertos en los test y negativamente con el número de fallos. Este dato nos da la idea de que los pacientes con mayor grado de leucopenia tienen menos aciertos y más fallos en las tareas de atención selectiva.

Por último, vemos que las correlaciones de los diferentes subtipos de linfocitos CD4 y CD8 nos indican que a mayor número de linfocitos de memoria y menor de linfocitos *naive* (es decir, mayor activación linfocitaria), menos aciertos y más fallos en atención cometen los pacientes del estudio. También un mayor número de linfocitos autoreactivos en sangre correlaciona con un peor resultado en cuanto a los aciertos de estos test.

Tabla 15. Correlaciones bivariada de diferentes parámetros con la puntuación de los test que evalúan la atención selectiva.

Coeficientes de correlación de Pearson	Atención selectiva				
	Stroop			Test de claves oral	
	Parámetros	Tarea congruente (Nº palabras)	Tarea Neutra (Nº colores)	Tarea incongruente (Nº ítems)	Aciertos
IL-6	-0,224**	-0,234**	-0,234**	-0,308***	
IL-21	-0,218*	-0,206*		-0,260**	
IL-17	-0,285**				0,192*
TGFβ	0,322*	0,400**	0,436**	0,450***	
IL-10		-0,204*		-0,237*	
IL-18				-0,264**	
CCL20	-0,357***	-0,238**	-0,314***	-0,371***	
TNFα	-0,364**	-0,359**	-0,396**	-0,481***	
IL-22		-0,288*			
CXCL13	-0,336**	-0,394**	-0,345**	-0,481***	
IL-15	-0,338**			-0,394**	
CX3CL1	-0,243*	-0,256*	-0,316**	-0,471***	
IgG 50KDa	-0,359*		-0,423*	-0,412*	
IgG 25KDa	-0,546**	-0,463**	-0,478**	-0,594***	
GATA3		0,377*			
AHR		-0,431*	-0,461*		
Leucocitos(x10e9u/L)	0,407**	0,353**	0,373**	0,382**	-0,274*
Linfocitos(x10e9u/L)	0,298*	0,281*	0,356**	0,316*	
Neutrófilos(x10e9u/L)	0,403**	0,327*	0,353**	0,409**	-0,303*
Linf. T(x10e9u/L)		0,259*	0,325*		
Linf. T CD4(x10e9u/L)	0,290*	0,289*	0,363**	0,283*	
CD4 Memoria				-0,276*	
CD4 MC				-0,270*	
CD4 ME				0,317*	
CD4+CD28-			-0,360**	-0,285*	
CD8 Naive			0,268*		
CD8 Memoria			-0,281*		
CD8 MC				-0,371**	0,328*
CD8 ME				0,380**	-0,294*
CD8+CD28-		-0,308*			

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). MC, memoria central; ME, memoria efectora.

Atención selectiva-sostenida y concentración mental: en la Tabla 16 se muestran los coeficientes de correlación estadísticamente significativos entre los parámetros estudiados y los resultados de las puntuaciones del test D2 utilizado para evaluar la atención selectiva-sostenida y la concentración mental.

En la Tabla 16 podemos sacar una conclusión parecida que en las correlaciones de la atención selectiva. En este apartado, se observa que el deterioro en la atención selectiva-sostenida y la concentración mental están relacionadas con un ambiente proinflamatorio, con el paso de los linfocitos *naïve* a memoria, el aumento de linfocitos autoreactivos y con la detección de la activación temprana por parte del marcador CD69 en varias poblaciones linfocitarias.

Se observa que la mayoría de citocinas proinflamatorias correlacionan con un menor número de aciertos, algunas como la IL-18 y las IL-22, con un mayor número de fallos y en general, con una menor efectividad total en la prueba y menor índice de concentración.

La activación de linfocitos T, tanto CD4, como CD8, detectada mediante el marcador CD69, presenta correlaciones positivas con el número de fallos (omisiones y comisiones) y negativas con el número de aciertos y la efectividad y concentración de la prueba D2.

Tabla 16. Correlaciones bivariada de diferentes parámetros con la puntuación del test que evalúa la atención selectiva-sostenida y concentración mental.

Coeficientes de correlación de Pearson	Atención selectiva-sostenida y concentración mental					
	D2					
Parámetros	Total de respuestas	Total de aciertos	Omisiones	Comisiones	TOT ^Δ	CON ^{ΔΔ}
TGFβ	0,369*	0,499***			0,528***	0,554***
IL-18			0,269*	0,366**		
IL-13			0,893**			
CCL20		-0,265*			-0,340**	-0,307*
TNFα		-0,320*			-0,386**	-0,314*
IL-22			0,491***			
CXCL13	-0,495***	-0,373**			-0,480**	-0,377**
IL-15	-0,358**	-0,257*			-0,316*	-0,303*
CX3CL1	-0,397**	-0,370**			-0,514**	-0,387**
IgG 25KDa					-0,490*	
AHR		-0,481**		0,446*	-0,437*	-0,544**
CD4 <i>Naive</i>		0,287*				
CD4 Memoria	-0,292*	-0,341*				-0,315*
CD4 ME					0,379**	0,343*
CD4+CD28-		-0,361*			-0,413**	-0,308*
CD8 Memoria		-0,329*				-0,337*
CD8 ME					0,399**	0,296*
CD8+CD28-		-0,336*				
CD69+(CD3)		-0,306*			-0,287*	-0,301*
CD69+(CD4 Mem.)			0,283*			
CD69+(CD4 MC)			0,362**			
CD69+(CD8 <i>Naive</i>)					-0,275*	
CD69+(CD8 MC)	0,318*		0,469**			
CD69+(CD8 ME)				0,400**		
CD69+(CD8+CD28-)						-0,284*

TOT: efectividad total en la prueba, CON: índice de concentración. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). MC, memoria central; ME, memoria efectora.

Memoria de trabajo: en la Tabla 17 se muestran los coeficientes de correlación estadísticamente significativos entre los parámetros estudiados y los resultados de las puntuaciones de los test que evalúan la memoria de trabajo, el test de dígitos oral y el test de letras y números oral.

Respecto al estudio de la memoria de trabajo de nuestros pacientes observamos que un ambiente proinflamatorio medido por las citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-21, CCL20, TNF α ...) correlaciona con un menor número de aciertos en los test evaluados. Mientras que, componentes antiinflamatorios como el TGF β o los factores de transcripción GATA3 y FoxP3, presentan correlaciones positivas con el número de aciertos.

Se observa que a mayor grado de leucopenia, obtenemos peores resultados en el número de aciertos de los test de dígitos oral y test de letras y números oral y a que el paso de linfocitos *naive* a memoria y la expansión de los CD4 autoreactivos, correlaciona con un menor número de aciertos y por lo tanto peores resultados en las test que evalúan la memoria del trabajo.

Tabla 17. Correlaciones bivariada de diferentes parámetros con la puntuación de los test que evalúan la memoria de trabajo.

Coeficientes de correlación de Pearson	Memoria de trabajo		
	Test de dígitos oral		Test de letras y números oral
Parámetros	Aciertos test directo	Aciertos test directo	Aciertos
IL-6		-0,256**	-0,195*
IL-21	-0,243**	-0,310**	-0,289**
TGFβ	0,422***	0,401**	0,464***
IL-10		-0,262**	
IL-18			-0,176*
CCL20	-0,271**	-0,287***	-0,290***
TNFα	-0,357**	-0,431***	-0,429***
CXCL13		-0,275*	-0,352**
IL-15	-0,327**	-0,362**	-0,271*
CX3CL1			-0,244*
IgG 25KDa	-0,440*		-0,414*
GATA3	0,359*		
FOXP3	0,483**		
Leucocitos(x10e9u/L)	0,206	0,327**	0,386**
Linfocitos(x10e9u/L)		0,289*	0,314*
Neutrófilos(x10e9u/L)		0,318*	0,402**
Linf. T CD4(x10e9u/L)	0,279*	0,241	0,316*
CD4 Naive		0,292*	0,309*
CD4 Memoria		-0,335**	-0,407***
CD4 MC		-0,284*	
CD4 ME	0,359**	0,324*	
CD4+CD28-			-0,334*
CD8 Naive			0,256*
CD8 Memoria		-0,270*	
CD8 MC		-0,346**	-0,282*
CD8 ME	0,291*		0,279*

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). MC, memoria central; ME, memoria efectora.

7.1.2. Alteraciones motoras

En la Tabla 18 se muestran los coeficientes de correlación estadísticamente significativos entre los parámetros estudiados y los resultados de los test utilizados para evaluar las alteraciones motoras, el test de coordinación bimanual y el test de coordinación visomotora.

Observamos, principalmente, que todos los componentes proinflamatorios correlacionan con un mayor tiempo empleado en la realización de los test de coordinación motora, tanto el bimanual como el visomotor.

Tabla 18. Correlaciones bivariada de diferentes parámetros con la puntuación de los test que evalúan coordinación motora.

Coeficientes de correlación de Pearson	Coordinación motora	
	Bimanual (min)	Visomotora (min)
IL-6	0,238**	0,352***
IL-17	0,229*	0,298***
TGFβ	-0,421***	-0,410***
IL-10	0,188*	
IL-18		0,187*
CCL20	0,403***	0,459***
TNFα	0,293*	0,366**
IL-1β		0,514*
IL-22	0,325*	0,320*
CXCL13	0,315**	0,304*
IL-15	0,262*	0,413***
CX3CL1	0,380***	0,483***
IgG 50KDa	0,381*	0,410*
IgG 25KDa	0,633***	0,608***
AHR	0,536**	0,441*
Leucocitos(x10e9u/L)	-0,285*	-0,319*
Linfocitos(x10e9u/L)		-0,283*
Neutrófilos(x10e9u/L)	-0,275*	-0,358**
CD4+CD28-	0,332*	0,374**
CD69+(CD4CD28-)	0,342*	

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

7.2. Correlación entre los diferentes parámetros estudiados y la detección de la encefalopatía hepática mínima clasificada por el PHES y estudio de la capacidad predictiva de los mismos.

Se llevó a cabo un estudio estadístico de correlaciones bivariadas con los diferentes parámetros analizados durante esta tesis. Los resultados significativos de la correlación entre cada parámetro y la puntuación obtenida en el PHES se muestran en la Tabla 19. Como podemos observar, gran parte de las interleucinas tienen una correlación significativa con coeficiente negativo, excepto en el caso del TGF β , que es positivo, ya que existe una disminución en los pacientes. Además, la cantidad de IgG detectada en plasma de pacientes correlaciona de manera significativa con la puntuación del PHES. Por otra parte, el número total de linfocitos T en sangre, tiene una correlación significativa con coeficiente positivo, aunque como ya hemos visto en apartados previos las medias poblacionales de estos parámetros no difieren entre pacientes cirróticos con o sin EHM. La activación de ciertas poblaciones con el marcador CD69 también muestra una correlación significativa con la puntuación del PHES.

Tabla 19. Correlaciones bivariada de diferentes parámetros con la puntuación del PHES.

Coeficientes de correlación de Spearman		Puntuación batería PHES	
Parámetros	PHES	Parámetros	PHES
IL-6	- 0.347***	Linfocitos T (x10e9u/L)	0.328*
IL-21	- 0.186*	Linfocitos T CD4 (x10e9u/L)	0.302*
TGFβ	0.459***	Linfocitos T CD8 (x10e9u/L)	0.280*
IL-10	- 0.394***	%CD4 ME	0.274*
IL-18	- 0.218**	%CD4+CD28-	- 0.355**
IL-13	- 0.254*	%CD8 MC	-0.284*
CCL20	- 0.319***	%CD8 ME	-0.299*
TNFα	- 0.420***	%CD69+(CD4+CD28-)	- 0.284*
CXCL13	- 0.541***	%CD69+(CD8 Naive)	-0.350*
IL-15	-0.341*	%CD69+(CD8 MC)	-0.355**
CX3CL1	-0.517***	%CD69+(CD8+CD28-)	-0.272*
IgG 25KDa	- 0.521**	%CD69+(Linfocitos B)	- 0.350*
Linfocitos (x10e9u/L)	0.361**		

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0.001$). MC, memoria central; ME, memoria efectora.

El siguiente paso para comprobar la capacidad predictiva de los parámetros que correlacionan de manera significativa con el PHES fue hacer las curvas COR (Característica Operativa del Receptor). A partir de aquí sacamos los datos de punto de corte, sensibilidad y especificidad de cada parámetro para predecir la aparición de la EHM. En la Tabla 20 los parámetros están ordenados de mayor a menor área bajo la curva.

De esta Tabla podemos decir que los parámetros con mayor capacidad predictiva de la EHM son la cantidad de IgG de cadena ligera en plasma, la IL-15, el CXCL13, la IL-6, el CX3CL1, la población activada de linfocitos CD4+CD28-, el porcentaje de la población CD4+CD28- sobre el total de CD4 y la IL-18 (mirar valores de sensibilidad y especificidad de predicción en la Tabla 20).

Podemos concluir que los procesos más predictivos e influyentes para la aparición de la EHM son los relacionados con la activación de los linfocitos B y la formación de centros germinales (proceso en el que participan la IgG y la CXCL13) y la activación y la posible infiltración de los CD4+CD28- (proceso en el que participan la IL-15, la CX3CL1, la población CD69+ sobre los CD4+CD28- y la población CD4+CD28- sobre el total de CD4). La IL-6 y la IL-18 nos indican un proceso de inflamación generalizada.

Tabla 20. Curvas COR de diferentes parámetros para determinar su capacidad predictiva.

Característica Operativa del Receptor (Curvas COR) ^{§§}					
Parámetros	ABCOR (95% IC)	p valor	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
IgG 25KDa	0,78 (0,60-0,97)	0,018	124 ^a	91	58
IL-15	0,77 (0,64-0,90)	<0,001	5,682 ^b	73	73
CXCL13	0,76 (0,63-0,88)	<0,001	159,6 ^b	68	81
IL-6	0,75 (0,66-0,84)	<0,001	2,7 ^b	70	76
CX3CL1	0,75 (0,62-0,88)	0,001	0,77 ^c	70	69
%CD69+ (CD4+CD28-)	0,73 (0,57-0,88)	0,016	0,7 ^d	50	72
%CD4+CD28-	0,70 (0,54-0,86)	0,020	28,9 ^d	63	72
IL-18	0,68 (0,57-0,79)	0,003	199,8 ^b	71	57

^{§§}Curvas COR (Característica Operativa del Receptor) para la sensibilidad y especificidad de los parámetros para el diagnóstico de la EHM en la cohorte de pacientes cirróticos. ABCOR, área bajo la curva COR; IC, intervalo de confianza. Punto de corte: ^a en % sobre el control, ^b en pg/mL, ^c en ng/mL y ^d en % sobre la población entre paréntesis.

Por último, quisimos verificar la importancia de la población de linfocitos CD4 autoreactivos (CD4+CD28-) en la aparición de la EHM en pacientes cirróticos. Para ello llevamos a cabo un análisis multivariante con todas las poblaciones estudiadas de linfocitos T *helper* y sus respectivas poblaciones activadas con el marcador CD69. En primer lugar llevamos a cabo el análisis univariantes para cada población y a continuación, hicimos un análisis multivariante con todos los parámetros que tuviesen resultados significativos en el análisis anterior.

En el análisis univariante, la presencia de EHM esta significativamente asociada con el porcentaje de la población de linfocitos CD4+CD28-, el porcentaje de células CD69+ en la

población de linfocitos CD4 *naive* y el porcentaje de células CD69+ en la población de linfocitos CD4+CD28- (ver Tabla 21).

El análisis multivariante, usando como variable dependiente la presencia de EHM y como independientes, aquellas variables significativas en el análisis univariante, muestra que el porcentaje de la población de linfocitos CD4+CD28- y el porcentaje de células CD69+ en la población de linfocitos CD4+CD28- están significativamente asociados ($p < 0,01$) a la aparición y presencia de la EHM (ver Tabla 21).

Concluimos que, efectivamente, la población con mayor capacidad predictiva para la aparición de la EHM es la de los linfocitos CD4+CD28-, tanto su número en sangre como su activación medida por el marcador CD69.

Tabla 21. Análisis de regresión logística univariada y multivariada de diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4 para la predicción de la EHM.

Análisis de regresión logística univariada	OR	95% IC	<i>p</i> valor
Variables independientes			
% CD4 <i>naive</i>	1,007	0,930-1,090	0,867
% CD4 memoria	0,994	0,938-1,053	0,836
% CD4+CD28-	1,037	1,009-1,066	0,010
% CD69+(CD4 <i>naive</i>)	1,598	1,003-2,545	0,048
% CD69+(CD4 memoria)	1,061	0,856-1,314	0,591
% CD69+(CD4+CD28-)	1,949	1,068-3,554	0,030
Análisis de regresión logística multivariada			
Variables predictoras			
% CD4+CD28-	1,059	1,018-1,102	0,005
% CD69+(CD4+CD28-)	2,769	1,295-5,917	0,009

En los tipos de análisis, uni- o multivariante, la variable dependiente fue la presencia de EHM de acuerdo con la clasificación del PHES. Las variables del análisis multivariante fueron aquellas con un *p* valor significativo ($p < 0,05$) en el análisis univariante. OR, Odds ratio; IC, Intervalo de Confianza.

V. Discusión

1. Alteraciones cognitivas y motoras en pacientes cirróticos con EHM

La encefalopatía hepática (EH) es una consecuencia del fallo hepático y conlleva un amplio rango de alteraciones neuropsiquiátricas, desde ligeros cambios en la personalidad o alteraciones en el ciclo sueño-vigilia, hasta alteraciones en la función cognitiva, en la coordinación motora y en el grado de consciencia. Entre el 30 y el 50% de los pacientes con cirrosis que no muestran signos clínicos de EH presentan encefalopatía hepática mínima (EHM) con un leve deterioro cognitivo. Los pacientes con EHM pueden presentar diversos déficits cognitivos (percepción visuoespacial, atención, concentración) y motores (enlentecimiento psicomotor) que no son detectables en un examen neurológico rutinario pero se ponen de manifiesto cuando se realizan test psicométricos específicos (Amodio et al., 2004).

Las alteraciones en la atención, velocidad de procesamiento de la información, coordinación motora, etc, tienen importantes consecuencias en la vida diaria de los pacientes (Dhiman y Chawla, 2009). Por ejemplo, la mayoría de los pacientes cirróticos con EHM tiene disminuida la capacidad de conducir vehículos (Schomerus et al., 1981, Bajaj et al., 2009, Felipe et al., 2013) y muestran un aumento del número de accidentes domésticos, laborales y de tráfico, caídas y hospitalizaciones (Román et al., 2011).

Se ha llegado a un consenso para diagnosticar la presencia de EHM utilizando los mismos test psicométricos en todos los hospitales. Para ello se seleccionó en 2002 como batería de referencia, la denominada PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score), compuesta por cinco test que evalúan 1) velocidad de procesamiento (test de Dígitos y Símbolos, Conexión Numérica A y B); 2) memoria de trabajo (test de Dígitos y Símbolos); 3) atención (test de Conexión Numérica A y B) y, 4) coordinación visuoespacial (test de Puntos Seriados y Línea Quebrada) (Weissenborn et al., 2001; Ferenci et al., 2002).

Para evaluar la presencia o no de EHM, los resultados de los test de cada paciente han de ser corregidos en función de su edad y nivel educativo y han de ser referidos a los obtenidos por la población general sin EHM, que varían ligeramente según los países. En España, la puntuación de cada test de la batería PHES y la global se obtienen mediante una aplicación informática utilizando los valores de referencia obtenidos para la población española normal por la Red Española de Encefalopatía Hepática (Romero-Gómez et al., 2006). La aplicación se encuentra en la página web

<http://www.redeh.org> y tiene en cuenta la edad y el nivel de estudios de los sujetos evaluados. Se clasifica a un paciente como con EHM cuando la puntuación global es -4 o menor. El paciente puede tener EHM debido a alteraciones cognitivas, motoras o al conjunto de ambos tipos, siendo éste el caso más frecuente (Felipo et al., 2012a).

1.1. Alteraciones cognitivas en pacientes con EHM

1.1.1. Atención selectiva

Para la evaluación de la atención selectiva, y velocidad de procesamiento mental se utilizaron los test de Stroop de colores y palabras (Stroop, 1935) y el test de Claves oral. En ambos casos los pacientes sin EHM obtuvieron peores resultados que los controles y este empeoramiento se vio más agravado en el caso de los pacientes con EHM.

El test de Stroop tiene como ventaja que no requiere una alta capacidad intelectual del individuo (sólo lectura y colores), tiene en cuenta la edad del sujeto y requiere poco tiempo para su realización, lo cual es una ventaja para la práctica clínica de rutina. Las limitaciones del test residen en que en los individuos con alta frecuencia de lectura o con dificultades para diferenciar colores se genera una interferencia mayor a la esperada.

Por tanto, el hecho de que pacientes sin EHM, según el PHES, tengan disminuida la velocidad de procesamiento mental y la atención selectiva indica que éstas son unas de las alteraciones más tempranas en pacientes con cirrosis, conduciendo posteriormente a la EHM.

1.1.2. Atención selectiva-sostenida y concentración mental

Para el estudio de la atención selectiva/sostenida y la concentración mental, se analiza la capacidad de atender selectivamente a ciertos aspectos relevantes de la tarea mientras se ignoran los irrelevantes de una forma rápida y precisa. Para evaluarla utilizamos el test d2. Este test proporciona diversos parámetros que nos permiten obtener información sobre diferentes alteraciones cognitivas de una manera concisa. Los resultados de este test, indican un déficit en la atención selectiva/sostenida y la concentración mental en los pacientes con EHM. Los pacientes sin EHM también muestran cierto déficit en la efectividad total de la prueba y el índice de concentración.

Por lo tanto, podemos concluir que alteraciones neurológicas de los pacientes afectan a la atención selectiva-sostenida y a la concentración mental y se producen tempranamente en el desarrollo de la EHM.

Este déficit atencional y en la concentración implica un deterioro de la calidad de vida del paciente con EHM, dificultando la realización de tareas que requieran estas funciones cognitivas como, por ejemplo, la conducción de vehículos.

1.1.3. Memoria de trabajo

En el estudio de la memoria de trabajo mediante los test de Dígitos y Letras y Números (batería WAIS) observamos que los pacientes con EHM son capaces de memorizar un menor número de series de ítems que los controles y pacientes sin EHM, presentando un déficit en la memoria de trabajo. Además los pacientes sin EHM también muestran una función cognitiva algo afectada desde la fase más temprana de EHM.

El déficit en la memoria de trabajo afecta a la capacidad de procesar y almacenar información verbal y visuoespacial afectando a la vida diaria de los pacientes pudiendo producir olvidos o desorientación.

1.2. Alteraciones en la coordinación motora

Los pacientes con EHM tienen disminuida la coordinación bimanual y visomotora, puesto que necesitan más tiempo para realizar la tarea que los sujetos sanos y que los pacientes sin EHM. Los pacientes sin EHM también tienen peor coordinación que los sujetos control, pero no llegan a mostrar una diferencia significativa. En cualquier caso, es evidente la disminución de la coordinación bimanual y visomotora en los pacientes con EHM. Las consecuencias en la vida diaria de las alteraciones en la coordinación motora son un empeoramiento de la calidad de vida, pudiendo sufrir caídas, hospitalizaciones y un enlentecimiento psicomotor.

En conclusión, los pacientes con EHM muestran déficits cognitivos, principalmente en atención (tanto selectiva como sostenida, velocidad de procesamiento mental y concentración), memoria de trabajo y, alteraciones en la coordinación motora. Estas alteraciones cognitivas serían las más tempranas en la progresión de la EHM, seguidas por el empeoramiento en la capacidad motora.

2. Hiperamonemia e inflamación en pacientes cirróticos con EHM

Es importante identificar cuáles son los factores asociados al fallo hepático, involucrados en la aparición de la EHM, que afectan a la función cerebral. Esto puede permitir identificar marcadores tempranos de EHM y diseñar tratamientos para revertirla o prevenir su progresión.

Los principales factores que contribuyen a la patogenia de la EHM son el amonio y la inflamación (Shawcross et al., 2004, Montoliu et al., 2009, Felipo et al., 2012a). Nuestro grupo, entre otros, ha demostrado que la hiperamonemia y la inflamación (con aumento de IL-6 e IL-18 en suero) son los principales factores que contribuyen a la EHM y actúan sinérgicamente en la inducción del deterioro neurológico (Shawcross et al., 2004, Cauli et al., 2007, Montoliu et al., 2009, Felipo et al., 2012b). También se ha descrito en otras enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, que la neuroinflamación juega un papel importante en el deterioro cognitivo (Szekely et al., 2004, Maccioni et al., 2009) y que el amonio podría contribuir a la demencia en dicha patología (Seiler 1993, 2002).

Los pacientes cirróticos presentan hiperamonemia, que alcanza niveles similares en los grupos sin y con EHM. El amonio es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) induciendo alteraciones en el sistema nervioso central. Se ha demostrado que la hiperamonemia crónica altera la vía del GMPc en cerebro y que este es responsable de algunos tipos de deterioro cognitivo (Felipo, 2013).

Se ha demostrado también, que la inflamación agrava las alteraciones neurológicas producidas por la hiperamonemia en pacientes cirróticos y que además, determina el grado de severidad de la EH en pacientes cirróticos con EH avanzada (Shawcross et al., 2004). En esta tesis se ha realizado un amplio estudio de citocinas en pacientes cirróticos, demostrando que los niveles de IL-6, IL-21, IL-17, IL-10, IFN γ , IL-18, CCL20, TNF α , CXCL13, IL-15 y CX3CL1 en suero están aumentados tanto en los cirróticos con o sin EHM, pero los pacientes con EHM muestran un aumento mayor que los pacientes sin EHM, sugiriendo una respuesta inmunológica más potente en los pacientes con EHM. En el caso del TGF β , los pacientes cirróticos muestran una disminución en suero independiente de la presencia de EHM. Además, los niveles de IL-12, IL-1 β e IL-22 muestran un incremento exclusivo de los pacientes con EHM, que no vemos en paciente sin EHM, sugiriendo que el aumento de estas interleucinas se produce en estadios más tardíos del desarrollo de la EHM.

Además, la IL-6, IL-21, TGF β , IL-10, IL-18, IL-13, CCL20, TNF α , CXCL13, IL-15 y CX3CL1 correlacionan significativamente con el grado de EHM (según puntuación del PHES), indicando que la inflamación es un contribuyente esencial al deterioro neurológico en la EHM.

Otra evidencia de la contribución de la inflamación al deterioro cognitivo y motor son las correlaciones establecidas entre todos los parámetros proinflamatorios estudiados y los resultados de los test de atención, concentración, memoria de trabajo y coordinación motora realizados en este estudio. Observamos que cuanto mayor es la concentración de citocinas proinflamatorias en suero, menor es el número de aciertos y mayor el número de fallos en los test. Por el contrario, niveles elevados de citocinas antiinflamatorias, como el TGF β , correlaciona con mayor número de respuestas correctas y por tanto mejor puntuación en el test. Lo mismo ocurre con la actividad motora, donde una inflamación mayor corresponde a un mayor tiempo necesario para realizar las tareas bimanual y visomotora.

Ocurre lo mismo en la activación de linfocitos, consecuencia de una mayor inflamación y un ambiente proinflamatorio. Observamos que existen una correlación entre el paso de linfocitos *naive* a linfocitos de memoria y la presencia del marcador de activación CD69, ambos indicadores de un proceso inflamatorio, con el empeoramiento en los resultados de los test de cognición y los motores.

Todos estos datos concluyen claramente que la inflamación tiene un papel fundamental en el desarrollo del deterioro neurológico, cognitivo y motor, en los pacientes cirróticos que presentan EHM.

La inflamación e hiperamonemia actúan sinérgicamente causando alteraciones neurológicas en la EHM. Los pacientes con EHM presentan niveles similares de amonio pero mayores de inflamación en sangre que los sin EHM. El hecho de que la inflamación esté relacionada con más alteraciones neurológicas que la hiperamonemia, indica que sería el grado de inflamación el que tendría más peso en la determinación de la aparición del deterioro neurológico.

3. Alteraciones en el inmunofenotipo de pacientes cirróticos con EHM

3.1. Daño hepático

La cirrosis es el resultado de un fallo hepático y en la clínica existen varios marcadores en sangre que pueden determinar los niveles de daño hepático. Nosotros estudiamos los marcadores periféricos de daño hepático en nuestros pacientes y los resultados aportados nos indican que la aparición de la EHM no es debida a la progresión del daño en el hígado.

Como vemos en el apartado 1.1 y 1.2 de resultados, los niveles de transaminasas, el MELD o el Child Pugh no difieren entre los dos tipos de pacientes, con o sin EHM. Tampoco vemos que la aparición de la EHM esté asociada a un mayor nivel del LPS en sangre de pacientes, por lo que no podemos decir que en el momento en el que los sujetos han participado en el estudio, los niveles de lipopolisacáridos bacterianos fuesen mayores en ninguno de los dos grupos de pacientes. Por lo tanto, la translocación bacteriana no debe ser la causa principal de los cambios observados en el sistema inmune de pacientes con EHM.

Sabemos que los pacientes cirróticos, ya de por sí, tienen alterado el sistema inmune. Como podemos ver en varios estudios (Lario et al., 2013, Bonnel et al., 2011, Sipeki, 2014), estos pacientes tienen un grado importante de leucopenia, niveles altos de amonio y LPS, activación de respuesta inmune, activación de los macrófagos del hígado (células de Kupffer) y un aumento en muchas de las interleucinas proinflamatorias. Sin embargo, debe haber algo más que determine que con el mismo nivel de daño hepático y mismo nivel de LPS en sangre, los pacientes con EHM presentan cambios más agravados o exclusivos que los diferencian de los pacientes cirróticos sin EHM.

Además, los cambios específicos observados en el inmunofenotipo de pacientes con EHM no correlacionan con el grado de daño hepático del paciente cirrótico, ni con un mayor nivel de LPS en sangre, por lo que estas no deben ser las causas de las alteraciones observadas en los pacientes con EHM, que no vemos en el resto de pacientes cirróticos sin EHM.

3.2. Poblaciones celulares en sangre

Los pacientes cirróticos presentan alteraciones en el sistema inmune, como la leucopenia o disminución del número de leucocitos en sangre (Lario et al., 2013). En esta tesis concluimos que los cambios visto en el inmunofenotipo asociados a la aparición de la EHM no son consecuencia de la leucopenia vista en pacientes cirróticos, ya que observamos valores similares en el número de células de todas las poblaciones leucocitarias en pacientes con y sin EHM. Esta disminución en el número de leucocitos es debida a una disminución en el número de linfocitos (linfopenia) y de neutrófilos (neutropenia). Centrándonos en el estudio de linfocitos, vemos una disminución parecida en el número de linfocitos B y T, tanto CD4 como CD8. Y de la misma manera, no vemos diferencias en la disminución de linfocitos T *naive*, de memoria, memoria central, memoria efectora ni en los CD28-, entre los dos tipos de pacientes.

Las únicas poblaciones que no muestran una alteración cuantitativa son los monocitos y las NK. Por otra parte, son los monocitos los únicos que presentan un pequeño aumento en el porcentaje de distribución respecto a los leucocitos totales, ya que en el resto de las poblaciones no vemos alterada la distribución en porcentajes sobre leucocitos en pacientes ni en controles.

De estos resultados podemos concluir que los pacientes cirróticos en general tienen alterado el sistema inmune y por ello son más propensos a tener infecciones o problemas asociadas a una inmunodeficiencia (Bonnell et al., 2011). Sin embargo, la aparición de la EHM en pacientes cirróticos no es debida al déficit en el número de linfocitos o neutrófilos en sangre. Por ello, el siguiente paso fue el estudio de las poblaciones más a fondo para discernir los cambios del sistema inmune asociado a la aparición del deterioro cognitivo.

3.3. Alteraciones específicas en las poblaciones leucocitarias en pacientes cirróticos asociadas a la aparición de la EHM

Atendiendo al estudio de la respuesta inmune, ya encontramos diferencias en la primera línea de defensa de los pacientes con EHM, la llamada inmunidad innata. Los monocitos forman parte de esta primera respuesta inmune y los pacientes con EHM presentan una activación mayor en este tipo celular, mostrada por un aumento de los monocitos con fenotipo proinflamatorio, los llamados monocitos intermedios. Estos monocitos son precursores de los macrófagos M1, también con fenotipo proinflamatorio (Boscá et al., 2015). Estos monocitos intermedios son productores de

interleucinas proinflamatorias como el TNF α , el CCL20, la IL-6, la IL-18, la IL-1 β y la IL-12 que van a promover un ambiente proinflamatorio que va a condicionar la diferenciación de otros tipos celulares como los linfocitos CD4 hacia fenotipos efectores. Además, estos monocitos/macrófagos proinflamatorios, son capaces de actuar como células presentadoras de antígenos con los linfocitos, de manera que contribuyen a la mayor activación linfocitaria que observamos en los pacientes con EHM.

Una diferencia principal en el inmunofenotipo de los pacientes con EHM la encontramos en la expansión de los linfocitos autoreactivos CD4+CD28- que presentan un incremento de 2,6 veces sobre los controles, el cual no ocurre en pacientes sin EHM. Esta población de linfocitos CD4+CD28- se encuentra aumentada en enfermedades autoinmunes y en procesos de envejecimiento y presenta funcionamientos aberrantes que contribuyen a la progresión del mantenimiento de las enfermedades inmunológicas crónicas y las disfunciones inmunes relacionadas con el envejecimiento (Dumitriu et al., 2009, Dumitriu, 2015, Maly y Schirmer, 2015). En estados patológicos, los linfocitos T CD4+CD28- representan un estado de senescencia celular prematura, como consecuencia de una persistente activación del sistema inmune, por lo que se pueden considerar como un biomarcador de inmunosenescencia. El grado de acumulación de los CD4+CD28- predice la severidad de las manifestaciones clínicas (Vallejo et al., 2004). Un incremento en la cantidad de CD4+CD28- en los pacientes con EHM podría estar reflejando una inmunosenescencia temprana y podría ser un biomarcador de disfunción inmunológica y de EHM.

Los linfocitos T CD4+CD28- son el resultado de repetidas estimulaciones antigénicas en autoinmunidad y en patologías que cursan con inflamación crónica. Además presentan un fenotipo citotóxico y tienen una capacidad pro-inflamatoria inherente (Broux et al., 2015). Son productoras de grandes cantidades de TNF α e IFN γ , por lo que promueven un ambiente proinflamatorio en el medio. Estos linfocitos autoreactivos expresan perforinas y granzimas que pueden lisar directamente las células endoteliales y dañar el tejido (Dumitriu et al., 2009, Dumitriu, 2015, Maly y Schirmer, 2015).

Además expresan moléculas de superficie como CD161, que facilita la migración trans-endotelial y la invasión de los tejidos (Vallejo et al., 2004) y el receptor CX3CR1 (receptor de CX3CL1 o fractalkina), que se expresa de manera exclusiva en los CD4+CD28- y no en los CD4+CD28+ (Broux et al., 2012a).

De notable importancia también es el hecho de que estas células CD4+CD28- se expanden e infiltran en el cerebro de pacientes con esclerosis múltiple. (Broux et al., 2012a, Broux et al., 2012b) Esta infiltración es conducida por CX3CR1 (Broux et al., 2012a, Broux et al., 2012b) y su ligando

CX3CL1 (expresado por células endoteliales), además de por la IL-15, que es capaz de amplificar las propiedades patogénicas de los linfocitos CD4+CD28- (Broux et al., 2015).

Por lo tanto, el incremento de la población de los CD4+CD28- en los pacientes con EHM indica una disfunción inmunológica más fuerte que en los pacientes cirróticos sin EHM, con una activación continua y persistente y un incremento en la producción de moléculas que pueden dañar la barrera endotelial y los tejidos. Esto puede facilitar la infiltración de los linfocitos autoreactivos en el cerebro de los pacientes con EHM, tal como ocurre en la esclerosis múltiple. Además, los pacientes con EHM también presentan un incremento en los niveles de CX3CL1 (fractalkina) en suero que atrae a su receptor CX3CR1 presente en los CD4+CD28- y de IL-15 en suero, que promueve la infiltración de estos linfocitos en cerebro. Tras poner en común todos estos resultados, proponemos el mecanismo de infiltración de los CD4+CD28- en cerebro de pacientes con EHM como uno de los posibles vías que contribuyen a la aparición de las alteraciones neurológicas en los pacientes con EHM (ver Figura 31).

Otro cambio que vemos en los pacientes con EHM, pero no en aquellos sin EHM, es un incremento en el marcador de activación temprana CD69 en todas las poblaciones de linfocitos CD4, especialmente la población de CD4+CD28-. El CD69 se expresa persistentemente en células T infiltradas en patologías que cursan con inflamación crónica (Sancho et al., 2005). Los linfocitos CD69+CD4+ se activan continuamente por péptidos propios y son patológicos a través de una regulación anormal en el balance de citocinas (Ishikawa et al., 1998). CD69 además controla la activación de los linfocitos T (De la Fuente et al., 2014).

El incremento de CD69 en pacientes con EHM indicaría una activación persistente de los linfocitos T CD4 que puede estar contribuyendo a la disfunción inmune, a la alteración del patrón de citocinas, a la diferenciación de los diferentes subtipos de CD4 y a la infiltración tisular.

En cuanto a los CD8 citotóxicos, no vemos que presenten cambios relacionados con la aparición de la EHM, ya que están alterados en los dos tipos de pacientes cirróticos. A excepción de una población de CD8 reguladora, los CD8+CD28-, los cuales están aumentados de manera significativa en los pacientes con EHM, aunque su activación no es mayor que en pacientes sin EHM. Esta población de linfocitos CD8, al contrario que los positivos para el marcador CD28, tienen función reguladora, en vez de citotóxica. Al igual que los CD4+CD28-, estas células CD8+CD28- son marcadores de inmunosenescencia y aumentan con la edad, de forma más pronunciada en el caso de las CD8 (Weng et al., 2009). Tienen capacidad supresora, tanto de manera directa (contacto célula-célula), como a través de la secreción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TFG β , las cuales están alteradas en ambos tipos de pacientes cirróticos, sin ser marcadores específicos de EHM.

Los pacientes con EHM además presentan un patrón anormal en la diferenciación de linfocitos CD4 en los diferentes subtipos celulares. Los linfocitos CD4 *naive* se pueden diferenciar en diferentes T *helper* (Th) efectores o reguladores: Th1, Th2, Th17, Th22, Th foliculares (Tfh) o T reguladoras inducibles (iTreg), cada una con unas características específicas (Gutcher y Becher, 2007, Kara et al., 2014, Tripathi y Lahesmaa, 2014). En la Figura 31 están representadas las citocinas más significativas que conducen a la diferenciación de cada subtipo celular, los factores de transcripción característicos de cada subpoblación de CD4 y las principales citocinas que secretan cada uno de ellos.

La desregulación de esta diferenciación da como resultado la patogénesis de diferentes enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Tripathi y Lahesmaa, 2014).

La diferenciación de los CD4 está mediada por la integración de señales por parte de las células presentadoras de antígeno, por los receptores de superficie y por las citocinas (Tripathi y Lahesmaa, 2014, Zhu y Paul, 2010).

Además, esta diferenciación también está controlada por la activación del receptor de célula T (TCR). Una activación fuerte del TCR favorece la diferenciación de Th1, Th17 y Tfh, mientras que una activación débil del TCR promueve la diferenciación de Th2 y de las iTreg (Tripathi y Lahesmaa, 2014, Yamane y Paul, 2012).

Para caracterizar las poblaciones de Th y las iTreg en pacientes con y sin EHM, analizamos los factores de transcripción característicos de cada uno de los subtipos celulares, las citocinas liberadas al medio por las células CD4 aisladas *in vitro* y los niveles de citocinas presentes en suero.

Los pacientes con EHM muestran un aumento en la diferenciación hacia los Th foliculares, caracterizados por la expresión del factor de transcripción BCL6 y la secreción de IL-21 (Crotty, 2011). Los pacientes con EHM mostraron un aumento en el nivel de expresión del factor de transcripción BCL6, que no observamos en los pacientes sin EHM. También detectamos un gran aumento de la IL-21 en suero de pacientes con EHM.

Además, las células CD4+ aisladas de la sangre de los pacientes con EHM liberan IL-21 *in vitro*, mientras que las mismas células de pacientes sin EHM no lo hacen.

Estos datos apoyan la idea de que los pacientes con EHM muestran una diferenciación mayor hacia las células Th foliculares, cosa que no ocurre en los pacientes sin EHM.

Como ya mencionamos anteriormente, la diferenciación de las Tfh requiere una activación fuerte del TCR (Receptor de célula T), la cual también favorece la diferenciación de los linfocitos Th17

y reduce la diferenciación hacia linfocitos iTreg y Th2. La expresión de los factores de transcripción FOXP3 y GATA3, característicos de iTreg y Th2 respectivamente, está disminuida en pacientes con o sin EHM, sugiriendo que la activación del TCR es más fuerte en pacientes que en controles y es más fuerte en pacientes con EHM (como vemos en la mayor diferenciación hacia Tfh) que en pacientes sin EHM.

Los pacientes con EHM, pero no los sin EHM, también muestran un aumento en la diferenciación de los Th22, caracterizados por la expresión del factor de transcripción AHR y por la liberación de IL-22 y TNF α (Tian et al., 2013). En los pacientes con EHM vemos un incremento en la expresión de AHR y un incremento en los niveles de IL-22 y de TNF α en suero. Además, las células CD4 aisladas de sangre de pacientes con EHM liberan IL-22, mientras que estas mismas células aisladas de pacientes sin EHM, no lo hacen.

Las Th22 están implicadas en la patogénesis y las alteraciones neuronales de enfermedades autoinmunes (Azizi et al., 2015). Las Th22 y la IL-22 están aumentadas en pacientes con esclerosis múltiple. El tratamiento de estos pacientes con IFN β -1a suprime las respuesta celulares de las Th22 y Th17 y hace que disminuya la desmielinización (Tao et al., 2015).

El incremento de las Th22 podría también contribuir a la aparición de alteraciones neurológicas en pacientes con EHM.

El incremento de la diferenciación de Tfh y Th22 en pacientes con EHM puede contribuir a la formación de órganos linfoides terciarios (TLOs), a la activación de linfocitos B (mostrado con el incremento de CD69 en células B) y al aumento de la formación de anticuerpos (mostrado con el aumento de IgG en plasma de pacientes con EHM).

Durante las respuestas inmunes crónicas, las células efectoras se pueden infiltrar en tejidos diana y organizarse en torno a los folículos de células B formando los centros germinales. Este fenómeno se llama formación de TLOs. Estos TLOs han sido identificados en diferentes tejidos en diferentes enfermedades, incluyendo el cerebro en casos de esclerosis múltiple (Grogan y Ouyang, 2012).

La IL-22 juega un papel importante en la formación de TLOs en las enfermedades autoinmunes. La IL-22 promueve la expresión de CXCL13, fundamental para el reclutamiento de células B y Tfh y para la formación de TLOs, contribuyendo a la activación de células B y a la infiltración en ciertas patologías autoinmunes (Barone et al., 2015).

El bloqueo de la IL-22 inhibe la expresión de CXCL13 y reduce la formación de los TLOs, la agregación de células B y la formación de auto-anticuerpos (Barone et al., 2015, Ciccina et al., 2013).

La expansión de las Th22 en pacientes con EHM podría facilitar la infiltración de células inmunes y la formación de TLOs en el cerebro, lo que podría contribuir al deterioro cognitivo, como ocurre en pacientes con esclerosis múltiple.

Hasta donde sabemos, la infiltración de las células inmunes en el cerebro de pacientes con EHM o EH no ha sido demostrada antes. Continuar con estos estudios para comprobar la posibilidad de la infiltración celular en cerebro podría ayudar a entender mejor la patogénesis de la EHM y la EH.

Ayudando esta idea de una posible infiltración, en resultados mostramos que existe un aumento exclusivo del precursor de MMP9 en plasma de pacientes con EHM. Esta metalopeptidasa está aumentada en patologías como la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide (Ram et al., 2006) y ayuda a la infiltración de linfocitos al ser una enzima capaz de degradar colágeno, elastina o mielina, entre otras, ayudando así a la ruptura de la BHE y promoviendo, por tanto, el posible paso de linfocitos a través de ella en los pacientes con EHM.

La infiltración de células del sistema inmune y la formación de TLOs podría estar ocurriendo en pacientes con EHM, sugerido por el incremento en la diferenciación de células T CD4⁺ hacia los Th foliculares, los principales activadores de las células B, que observamos en los pacientes con EHM.

Los Tfh son necesarios para la formación y mantenimiento de los centros germinales y regulan la diferenciación de las células B hacia células plasmáticas y células B de memoria. Los Tfh migran en respuesta al CXCL13 y se recolocan en los folículos alrededor de las células B ejerciendo un papel importante en las enfermedades autoinmunes (Crotty, 2011).

Los pacientes con EHM muestran, además de un incremento en la diferenciación de los Tfh, un incremento de CXCL13 de 3,3 veces en el suero. Esto sugiere una mayor migración por parte de los Tfh y de las células B hacia centros germinales, con una consecuente alteración en la regulación de los linfocitos B en pacientes que presentan EHM. De hecho, los pacientes con EHM muestran un incremento en la expresión de CD69 en linfocitos B, indicando una mayor activación de este tipo celular, que también se ve reflejada en un incremento de la IgG en plasma.

Un aumento de los niveles de CCL20 en suero también contribuye a la infiltración de linfocitos T y B. CCL20 (también conocida como MIP-3 α) es una citocina quimioatrayente de los linfocitos T y B (Liao et al., 1999, Krzysiek et al., 2000) y es fuertemente inducida en las células endoteliales por el

TNF α y la IL-6. Por ello, el aumento del CCL20 en pacientes con EHM puede estar contribuyendo también a la infiltración linfocitaria.

Los linfocitos B activados se infiltran en el tejido cerebral en casos de derrame cerebral y esclerosis múltiple, tanto en humanos como en ratones, e inducen una respuesta autoinmune que media el deterioro cognitivo, el cual se puede prevenir con la ablación de linfocitos B de forma genética o farmacológica (Doyle et al., 2015). Los linfocitos T podrían estar implicados en el mecanismo por el cual los linfocitos B inducen la disfunción cognitiva. Los linfocitos T por si solos parecen no ser suficientes para provocar el deterioro cognitivo pero junto con la presencia de linfocitos B son capaces de inducirlo (Doyle et al., 2015).

Existe un tráfico de linfocitos B entre la sangre periférica y el cerebro en esclerosis múltiple. Estructuras similares a folículos de células B han sido encontradas en meninges de pacientes con esclerosis múltiple (Pröbstel et al., 2015, Serafini et al., 2004). Podemos decir que las células B juegan un papel importante en la patogénesis de la esclerosis múltiple, como se muestra claramente con el éxito de las terapias clínicas basadas en los linfocitos B (Pröbstel et al., 2015). Un aumento en la activación de los linfocitos B y en la producción de anticuerpos podría ser, por tanto, otro mecanismo que contribuye a la aparición de la EHM en pacientes cirróticos.

Otro mecanismo por el cual la inflamación periférica puede inducir alteraciones neurológicas en la EHM es la activación de receptores en células endoteliales por parte de interleucinas periféricas (TNF α , IL-1 β , IL-6), produciendo la liberación de factores inflamatorios en el cerebro, lo cual llevaría a la neuroinflamación y alteración neurológica.

Por ejemplo, en ratas inyectadas con LPS, la IL-6 en sangre activa su receptor en las células endoteliales dando lugar a la activación de la vía del STAT3, el cual provoca un aumento de la ciclooxigenasa 2 y prostaglandina E2 en el córtex cerebral (Rummel et al., 2006). En pacientes con EHM hemos visto un aumento en la activación (fosforilación) de la vía del STAT3 en PBMC, que lo relacionamos con un aumento en la diferenciación de linfocitos T hacia y Tfh y la activación de los linfocitos B.

Los pacientes con EHM tienen similitudes con las deficiencias en el sistema inmune de pacientes con patologías autoinmunes, como es el caso de la esclerosis múltiple. Uno de los datos más concluyentes que apoya de idea de que la EHM tiene un componente autoinmune es la deficiencia en la expresión del HLA medida en sangre. Observamos que en pacientes con EHM, pero no en aquellos sin EHM, existe un decremento en la expresión del MHC clase II, molécula de unión a los linfocitos CD4. Al presentar una disminución en la expresión de este complejo receptor, los linfocitos CD4 no van a

reconocer células del organismo como propias, por lo que podrán activarse y atacar a células del propio sistema, de manera que se podría estar dando un ataque autoinmune en los pacientes con EHM.

Apoyando las hipótesis expuestas a lo largo de esta discusión, con el estudio de la capacidad predictiva de los diferentes parámetros estudiados para el diagnóstico de la EHM, observamos que la población de CD4+CD28- es una variable predictora de la aparición de la EHM. Como vemos en la Tabla 21 de resultados, tanto la activación de los linfocitos CD4 *naive* como la activación de la población CD4+CD28- y la expansión de esta misma población, son variables predictoras de la EHM en un análisis univariante. Este resultado nos está indicando que los cambios de que vemos en la activación de estas poblaciones y la expansión de los linfocitos CD4 autoreactivos son cambios decisivos asociados a la aparición de la EHM en pacientes cirróticos. Además, en la Tabla 20 de las curvas COR, vemos que esta población autoreactiva tiene una relevancia significativa a la hora de evaluar la capacidad predictora de los parámetros estudiados, por lo que podríamos proponer la expansión de los CD4+CD28- y su activación como biomarcadores de EHM, de la misma manera que se consideran biomarcadores de inmunosenescencia.

Además de este posible biomarcador, también podemos proponer como tal, la activación de los linfocitos B y la formación de centros germinales. Para apoyar este dato, observamos la mayor área bajo la curva en el parámetro de la IgG en plasma, como indicador de la activación de los linfocitos B. También, con una especificidad y sensibilidad predictivas altas, mostramos el parámetro CXCL13 que participa en la quimioatracción de los linfocitos B y de los Tfh que ayudarían a la activación de los linfocitos B y a su organización de centro germinales. Además, tanto la IL-21 (producida por los Tfh), como la activación de los linfocitos B (células B CD69+), presentan una correlación significativa con la puntuación del PHES, indicando con todo ello que el proceso de formación de centros germinales y activación de linfocitos B es un proceso que está contribuyendo al desarrollo de la EHM y puede ser considerado como otro posible biomarcador de EHM.

Como resumen general, en la Figura 31 observamos una serie de cambios en los pacientes con EHM que vemos reflejados con las flechas del esquema. En primer lugar, atendemos a los monocitos representados por los marcadores de superficie CD14 y CD16, con mayor o menos expresión en función de si son clásicos, intermedios o no clásicos. Las flechas rojas nos indican que hay una disminución de la población clásica (CD14++CD16-) y un aumento de la población intermedia (CD14++CD16+) en los pacientes con EHM. Esto va a provocar, por una parte, que haya mayor producción de citocinas proinflamatorias por parte de los monocitos/macrófagos intermedios que va a propiciar un ambiente proinflamatorio que condicionará la diferenciación de los diferentes subtipos de linfocitos CD4. Por

otra parte, estos mismos macrófagos M1 van a actuar como CPA con los linfocitos, de manera que pueden activar a los linfocitos *naive*.

Observamos un aumento de los linfocitos autoreactivos CD4+CD28- en los pacientes con EHM. Esta población celular va a ser atraída hacia gradientes de CX3CL1 ayudados por la IL-15 (vemos que ambas citocinas están aumentadas en EHM). El CX3CL1 puede ser producido en células endoteliales y las IL-15 en células de tejido nervioso, entre otras. Proponemos la primera hipótesis de infiltración de CD4+CD28- a través de la BHE, promovida por el aumento de CX3CL1 e IL-15 en el medio.

Vemos un cambio de los linfocitos *naive* hacia los de memoria en ambos tipos de pacientes (indicado con flechas grises). Por el contrario, observamos un mayor número de células positivas para el marcador de activación CD69, exclusivo en pacientes con EHM, en varios tipos celulares, como los linfocitos CD4, tanto CD28+ como CD28-, en los CD4 *naive*, en los CD4 de memoria y en los linfocitos B.

A partir del aumento de ciertas citocinas proinflamatorias en suero de pacientes con EHM, como el TNF α , la IL-6 y la IL-1 β , que tienen sus receptores en células endoteliales, proponemos nuestra segunda hipótesis, la transmisión de señales a través de los receptores de interleucinas en células endoteliales. Tras desencadenar la cascada de transmisión de señales, causarían un efecto directo sobre las células neurales al otro lado de las BHE.

Los linfocitos CD4 *naive* se diferencian en varias subpoblaciones en función de ciertos factores que condicionan el medio. Vemos en el esquema que las dos subpoblaciones principales aumentadas en pacientes con EHM son los Th22 y los Tfh, corroborado también con el aumento de las citocinas que producen. La IL-21 favorece a la diferenciación de los Th17 e inhibe a las iTreg, como indican las flechas del esquema, pero su principal función es la activación de los linfocitos B. Por ello, vemos una mayor producción de IgG en los pacientes con EHM y la posible formación de centros germinales. Además, la IL-22, la IL-17 y la IL-21 favorecen la secreción de CXCL13, desde estos centros germinales, cuya función es atraer a los linfocitos B y los Thf hacia los mismos.

Se muestra en el esquema de la figura 31 la quimioatracción de los linfocitos Th22 y Th17 hacia gradientes de CCL20 secretada por células endoteliales.

A partir de estos datos establecemos nuestras dos últimas hipótesis, la infiltración de Tfh y la posible formación de órganos linfoides terciarios dentro del cerebro de pacientes con EHM, que estaría propiciada por los propios Tfh infiltrados.

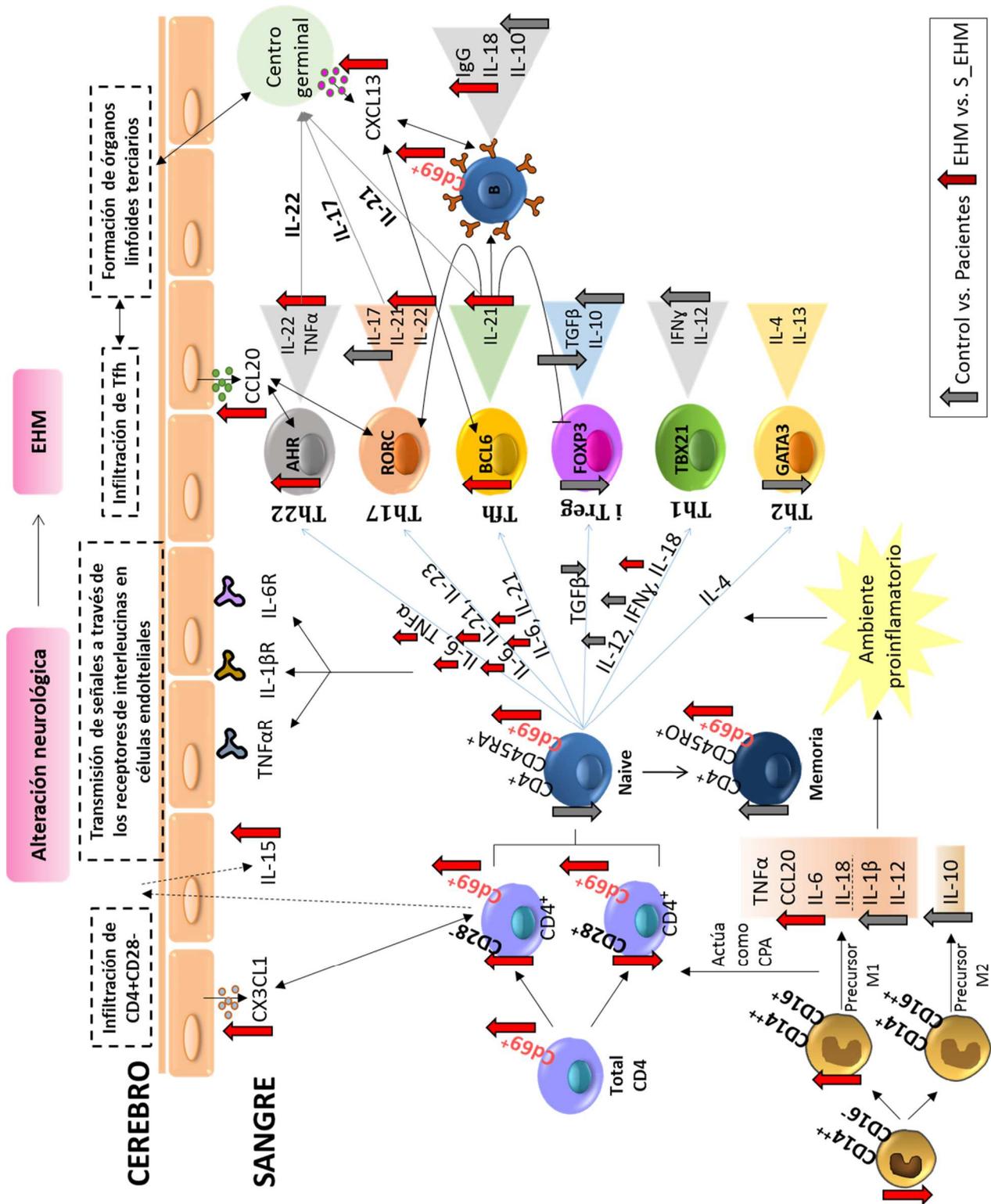


Figura 31. Esquema resumen de los cambios en el sistema inmune asociados a la aparición de la EHM. Resultados vistos en el estudio del inmunofenotipo de pacientes con EHM y las posibles hipótesis (encuadradas en líneas discontinuas) de las causas de la aparición de la disfunción cerebral que conlleva a la EHM. Las flechas hacia arriba indican aumento y hacia abajo indican disminución, el color gris compara los datos de los controles con los pacientes cirróticos y el color rojo compara los datos de pacientes con EHM con los de los pacientes sin EHM (S_EHM). Las flechas discontinuas indican posible infiltración o paso de la BHE. Las flechas de doble sentido indican atracción o relación.

Este estudio ha identificado alteraciones específicas del sistema inmune asociadas a la aparición de alteraciones neurológicas en pacientes cirróticos con EHM. Las principales alteraciones descritas asociadas a la EHM son: 1) El incremento de la activación de todos los subtipos de linfocitos CD4, indicado por un aumento de la expresión del marcador CD69; 2) aumento en la cantidad de linfocitos CD4+CD28- asociado con un incremento de los niveles de CX3CL1 y de IL-15, que pueden promover su infiltración en cerebro; 3) aumento en la diferenciación de los linfocitos CD4 hacia Tfh y Th22, que pueden promover la formación de órganos linfoides terciarios; 4) aumento de la activación de los linfocitos B y su producción de IgG. Estas cuatro alteraciones inmunológicas pueden contribuir, de manera conjunta o independiente, a la aparición de alteraciones neurológicas asociadas a la EHM en pacientes cirróticos.

A partir de estos resultados, podemos sugerir una serie de posibles mecanismos mediante los cuales, cambios vistos en la inflamación periférica de pacientes con EHM, pueden contribuir a la aparición de alteraciones neurológicas (resumido en Figura 31): a) infiltración en el cerebro de los linfocitos CD4+CD28-, dando lugar a la neuroinflamación y deterioro neurológico; b) activación de receptores de células endoteliales por la interleucinas periféricas (TNF α , IL-1 β , IL-6) provocando la liberación de factores inflamatorios en el cerebro, neuroinflamación y deterioro neurológico; c) infiltración de linfocitos Tfh y formación de órganos linfoides terciarios con centros germinales, conteniendo células B, dando lugar al deterioro neurológico.

A partir de aquí, sería necesaria la continuidad de estos estudios para caracterizar mejor la contribución de los cambios inmunológicos en las alteraciones neurológicas y su posible utilidad en el diagnóstico temprano de la EHM en pacientes cirróticos.

VI. Conclusiones

1. Los pacientes con EHM presentan alteraciones cognitivas y motoras medidas por test de atención, concentración, memoria de trabajo y coordinación motora. Algunas de estas alteraciones se detectan incluso en pacientes clasificados como sin EHM por la batería PHES, indicando que ésta no es suficientemente sensible para diagnosticar la EHM.
2. La inflamación es el factor determinante de la aparición y progresión de la EHM y sus alteraciones neurológicas.
3. El grado de daño hepático y la leucopenia de los pacientes cirróticos no determinan la aparición de la EHM ni los cambios en el inmunofenotipo asociados a la misma.
4. Los pacientes con EHM presentan un aumento en el número de monocitos proinflamatorios en sangre y un ambiente proinflamatorio en suero que condicionan la activación y el tipo de diferenciación de los linfocitos.
5. Los pacientes con EHM presentan un aumento en el estado de activación de varios subtipos de linfocitos T y B, como indican el aumento del marcador CD69 y de citocinas proinflamatorias en suero.
6. Los pacientes con EHM presentan un aumento en la cantidad de linfocitos CD4+CD28- asociado con un aumento de los niveles de CX3CL1 y de IL-15, que pueden promover su infiltración en cerebro.
7. Los pacientes con EHM presentan un aumento en la diferenciación de los linfocitos CD4 a Tfh y Th22, que pueden promover la formación de órganos linfoides terciarios.
8. Los pacientes con EHM presentan un aumento de la activación de los linfocitos B y de la producción de IgG.
9. Los pacientes con EHM, por tanto, presentan una serie de cambios en su inmunofenotipo que no ocurren en los pacientes sin EHM y que se asocian específicamente a la aparición de alteraciones neurológicas y de la EHM.

VII. Bibliografía

- Affò, S. et al. 2014. CCL20 mediates lipopolysaccharide induced liver injury and is a potential driver of inflammation and fibrosis in alcoholic hepatitis. *Gut*. 63, 11 (Nov. 2014), gutjnl-2013-306098.
- Alarcón, F. and Giménez-Roldán, S. 2005. Systemic diseases that cause movement disorders. *Parkinsonism & Related Disorders*. 11, 1 (Jan. 2005), 1–18.
- Alexander, C. and Rietschel, E.T. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of endotoxin research*. 7, 3 (Jan. 2001), 167–202.
- Alvarez, F. et al. 1999. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*. 31, 5 (Nov. 1999), 929–38.
- Amodio, P., Montagnese, S., Gatta, A. and Morgan, M.Y. 2004. Characteristics of minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. 19, 3-4 (Dec. 2004), 253–67.
- Amodio, P., Schiff, S., Del Piccolo, F., Mapelli, D., Gatta, A. and Umiltà, C. 2005. Attention dysfunction in cirrhotic patients: an inquiry on the role of executive control, attention orienting and focusing. *Metabolic brain disease*. 20, 2 (Jun. 2005), 115–27.
- Aoki, Y., Hirai, K. and Tanikawa, K. 1993. Mechanism of thrombocytopenia in liver cirrhosis: kinetics of indium-111 tropolone labelled platelets. *European journal of nuclear medicine*. 20, 2 (Feb. 1993), 123–9.
- Arosa, F.A. 2002. CD8+CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. *Immunology and cell biology*. 80, 1 (Feb. 2002), 1–13.
- Aseni, P., Frangi, M., Beati, C., Vertemati, M. and Romani, F. 1988. Is thrombocytopenia in liver failure dependent on an inadequate synthesis of thrombopoietic stimulating factor by the liver. *Medical hypotheses*. 26, 4 (Aug. 1988), 217–9.
- Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A. and Trinchieri, G. 1998. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 160, 12 (Jun. 1998), 5936–44.
- Attridge, K., Wang, C.J., Wardzinski, L., Kenefeck, R., Chamberlain, J.L., Manzotti, C., Kopf, M. and Walker, L.S. 2012. IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis. *Blood*. 119, 20 (May 2012), 4656–64.
- Azizi, G., Yazdani, R. and Mirshafiey, A. 2015. Th22 cells in autoimmunity: a review of current knowledge. *European annals of allergy and clinical immunology*. 47, 4 (Jul. 2015), 108–17.
- Backert, I. et al. 2014. STAT3 activation in Th17 and Th22 cells controls IL-22-mediated epithelial host defense during infectious colitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 193, 7 (Oct. 2014), 3779–91.
- Bajaj, J. et al. 2009. Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 50, 4 (Oct. 2009), 1175–83.
- Bajaj, J. et al. 2013. The Stroop smartphone application is a short and valid method to screen for minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 58, 3 (Sep. 2013), 1122–1132.

- Banks, W.A. 2005. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Current pharmaceutical design*. 11, 8 (Jan. 2005), 973–84.
- Barone, F. et al. 2015. IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112, 35 (Sep. 2015), 11024–9.
- Belarbi, K., Jopson, T., Tweedie, D., Arellano, C., Luo, W., Greig, N.H. and Rosi, S. 2012. TNF- α protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*. 9, (Jan. 2012), 23.
- Benjamini, Y and Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological)* 57, 1 (Jul. 1995), 289-300.
- Bentivoglio, M., Mariotti, R. and Bertini, G. 2011. Neuroinflammation and brain infections: historical context and current perspectives. *Brain research reviews*. 66, 1-2 (Jan. 2011), 152–73.
- Berard, M. and Tough, D.F. 2002. Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology*. 106, 2 (Jun. 2002), 127–38.
- Berg, R.D. 1999. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Advances in experimental medicine and biology*. 473, (Jan. 1999), 11–30.
- Berglund, L. et al. 2013. IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood*. 122, 24 (Dec. 2013), 3940–3950.
- Bernuzzi, F., Fenoglio, D., Battaglia, F., Fravega, M., Gershwin, M.E., Indiveri, F., Ansari, A.A., Podda, M., Invernizzi, P. and Filaci, G. 2010. Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity*. 35, 3 (Nov. 2010), 176–80.
- Blaschitz, C. and Raffatellu, M. 2010. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *Journal of clinical immunology*. 30, 2 (Mar. 2010), 196–203.
- Block, M.L., Zecca, L. and Hong, J.-S.S. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience*. 8, 1 (Jan. 2007), 57–69.
- Bonnel, A., Bunchorntavakul, C. and Reddy, R. 2011. Immune Dysfunction and Infections in Patients with Cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 9, 9 (Sep. 2011), 727–38.
- Boscá, L., González-Ramos, S., Prieto, P., Fernández-Velasco, M., Mojena, M., Martín-Sanz, P. and Alemany, S. 2015. Metabolic signatures linked to macrophage polarization: from glucose metabolism to oxidative phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*. 43, 4 (Aug. 2015), 740-4.
- Brady, J., Carotta, S., Thong, R.P., Chan, C.J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J. and Nutt, S.L. 2010. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 185, 11 (Dec. 2010), 6679–88.
- Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. and Feldmann, M. 1989. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)*. 2, 8657 (Jul. 1989), 244–7.

- Brickenkamp R (2009). Test d2. *Adaptación de TEA Ediciones*.
- Broux, B., Markovic-Plese, S., Stinissen, P. and Hellings, N. 2012a. Pathogenic features of CD4+CD28- T cells in immune disorders. *Trends in molecular medicine*. 18, 8 (Aug. 2012), 446–53.
- Broux, B., Mizze, M.R., Vanheusden, M., van der Pol, S., van Horsen, J., Van Wijmeersch, B., Somers, V., de Vries, H.E., Stinissen, P. and Hellings, N. 2015. IL-15 amplifies the pathogenic properties of CD4+CD28- T cells in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 194, 5 (Mar. 2015), 2099–109.
- Broux, B., Pannemans, K., Zhang, X., Markovic-Plese, S., Broekmans, T., Eijnde, B.O., Van Wijmeersch, B., Somers, V., Geusens, P., van der Pol, S., van Horsen, J., Stinissen, P. and Hellings, N. 2012b. CX(3)CR1 drives cytotoxic CD4(+)CD28(-) T cells into the brain of multiple sclerosis patients. *Journal of autoimmunity*. 38, 1 (Feb. 2012), 10–9.
- Burkhard, P.R., Delavelle, J., Du Pasquier, R. and Spahr, L. 2003. Chronic parkinsonism associated with cirrhosis: a distinct subset of acquired hepatocerebral degeneration. *Archives of neurology*. 60, 4 (Apr. 2003), 521–8.
- Bustamante, J., Rimola, A., Ventura, P.J., Navasa, M., Cirera, I., Reggiardo, V. and Rodés, J. 1999. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology*. 30, 5 (May 1999), 890–5.
- Cagnin, A., Taylor-Robinson, S.D., Forton, D.M. and Banati, R.B. 2006. In vivo imaging of cerebral “peripheral benzodiazepine binding sites” in patients with hepatic encephalopathy. *Gut*. 55, 4 (Apr. 2006), 547–53.
- Camporeale, A. and Poli, V. 2012. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 17, (Jan. 2012), 2306–26.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J. and Felipo, V. 2007. Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*. 46, 2, (Aug. 2007), 514-9.
- Ceeraz, S., Hall, C., Choy, E.H., Spencer, J. and Corrigan, V.M. 2013. Defective CD8+CD28+ regulatory T cell suppressor function in rheumatoid arthritis is restored by tumour necrosis factor inhibitor therapy. *Clinical and experimental immunology*. 174, 1 (Oct. 2013), 18–26.
- Chaplin, D.D. 2010. Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 125, 2 Suppl 2 (Feb. 2010), S3–23.
- Chen, X.-W.W. and Zhou, S.-F.F. 2015. Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF-κB axis, and tumorigenesis. *Drug design, development and therapy*. 9, (Jan. 2015), 2941–6.
- Child, C.G. and Turcotte, J.G. 1964. Surgery and portal hypertension. *Major problems in clinical surgery*. 1, (Jan. 1964), 1–85.
- Choo, S.Y. 2007. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei medical journal*. 48, 1 (Feb. 2007), 11–23.
- Christensen, A.L. 1984. Neuropsychological investigation with Luria’s methods. *Scandinavian journal of work, environment & health*. 10 Suppl 1, (Jan. 1984), 33–4.
- Ciccia, F., Giardina, A., Rizzo, A., Guggino, G., Cipriani, P., Carubbi, F., Giacomelli, R. and Triolo, G. 2013. Rituximab modulates the expression of IL-22 in the salivary glands of patients with primary Sjogren’s syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*. 72, 5 (May 2013), 782–3.

Clemmesen, J.O., Larsen, F.S., Kondrup, J., Hansen, B.A. and Ott, P. 1999. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 29, 3 (Mar. 1999), 648–53.

Compañy, L., Zapater, P., Pérez-Mateo, M. and Jover, R. 2010. Extrapramidal signs predict the development of overt hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 22, 5 (May 2010), 519–25.

Conn, H.O., Lieberthal, M. M. 1979. The hepatic coma syndromes and lactulose. *Yale Journal of Biology & Medicine*. 52, 2 (Sept-Oct. 1979), 487-8.

Cooper, A.J. 1993. Ammonia metabolism in mammals: interorgan relationships. *Advances in experimental medicine and biology*. 341, (Jan. 1993), 21–37.

Córdoba, J., Cabrera, J., Lataif, L., Penev, P., Zee, P. and Blei, A. 1998. High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology*. 27, 2 (Feb. 1998), 339–345.

Corthay 2009. How do Regulatory T Cells Work? *Scandinavian Journal of Immunology*. 70, 4 (Oct. 2009), 326–36.

Crotty, S. 2011. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual review of immunology*. 29, (Jan. 2011), 621–63.

Cui, W., Liu, Y., Weinstein, J.S., Craft, J. and Kaech, S.M. 2011. An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells. *Immunity*. 35, 5 (Nov. 2011), 792–805.

Czaja, A.J. 1996. Diagnosis and therapy of autoimmune liver disease. *The Medical clinics of North America*. 80, 5 (Sep. 1996), 973–94.

D’Mello, C., Le, T. and Swain, M.G. 2009. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor- α signaling during peripheral organ inflammation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 29, 7 (Feb. 2009), 2089–102.

Dansokho, C., Ait Ahmed, D., Aid, S., Toly-Ndour, C., Chaigneau, T., Calle, V., Cagnard, N., Holzenberger, M., Piaggio, E., Aucouturier, P. and Dorothée, G. 2016. Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain : a journal of neurology*. 139, Pt 4 (Apr. 2016), 1237–51.

De la Fuente, H., Cruz-Adalia, A., Martinez Del Hoyo, G., Cibrián-Vera, D., Bonay, P., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Navarro, P., Gutierrez-Gallego, R., Ramirez-Huesca, M., Martín, P. and Sánchez-Madrid, F. 2014. The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Molecular and cellular biology*. 34, 13 (Jul. 2014), 2479–87.

Dendrou, C., Fugger, L. and Friese, M. 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 15, 9 (Dec. 2015), 545–558.

Dhiman, R.K. and Chawla, Y.K. 2009. Minimal hepatic encephalopathy. *Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. 28, 1, (Jan-Feb. 2009), 5-16.

- Dinarelli, C.A., Novick, D., Kim, S. and Kaplanski, G. 2013. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in immunology*. 4, (Jan. 2013), 289.
- Doukas, J., Pober, J.S. 1990. IFN-gamma enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *The Journal of Immunology*. 145, (Sep. 1990) 1727-33.
- Doyle, K.P., Quach, L.N., Solé, M., Axtell, R.C., Nguyen, T.-V.V., Soler-Llavina, G.J., Jurado, S., Han, J., Steinman, L., Longo, F.M., Schneider, J.A., Malenka, R.C. and Buckwalter, M.S. 2015. B-lymphocyte-mediated delayed cognitive impairment following stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 35, 5 (Feb. 2015), 2133–45.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*. 10, 8 (Aug. 2009), 857–63.
- Dumitriu, I.E. 2015. The life (and death) of CD4+ CD28 (null) T cells in inflammatory diseases. *Immunology*. 146, 2 (Oct. 2015), 185–93.
- Dumitriu, I.E., Araguás, E.T., Baboonian, C. and Kaski, J.C. 2009. CD4+ CD28 null T cells in coronary artery disease: when helpers become killers. *Cardiovascular research*. 81, 1 (Jan. 2009), 11–9.
- Fabene, P.F. et al. 2008. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nature medicine*. 14, 12 (Dec. 2008), 1377–83.
- Farina, C., Aloisi, F. and Meinl, E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*. 28, 3 (Mar. 2007), 138–45.
- Feldmann, M., Brennan, F.M., Foxwell, B.M. and Maini, R.N. 2001. The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Current Directions in Autoimmunity*. 3, (2001), 188-99.
- Felipo, V. 2013. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature reviews. Neuroscience*. 14, 12 (Dec. 2013), 851–8.
- Felipo, V. and Butterworth, R.F. 2002. Neurobiology of ammonia. *Progress in neurobiology*. 67, 4 (Jul. 2002), 259–79.
- Felipo, V., Ordoño, J.F., Urios, A., El Mlili, N., Giménez-Garzó, C., Aguado, C., González-Lopez, O., Giner-Duran, R., Serra, M.A., Wassel, A., Rodrigo, J.M., Salazar, J. and Montoliu, C. 2012b. Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 55, 2 (Feb. 2012), 530–9.
- Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., Garcia-Torres, M.L., Civera, M., Olmo, J.A., Ortega, J., Martinez-Valls, J., Serra, M.A., Cassinello, N., Wassel, A., Jordá, E. and Montoliu, C. 2012a. Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. 27, 1 (Mar. 2012), 51–8.
- Felipo, V., Urios, A., Valero, P., Sánchez, M., Serra, M.A., Pareja, I., Rodríguez, F., Gimenez-Garzó, C., Sanmartín, J. and Montoliu, C. 2013. Serum nitrotyrosine and psychometric tests as indicators of impaired fitness to drive in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 33, 10 (Nov. 2013), 1478–89.

- Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K. and Blei, A.T. 2002. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 35, 3 (Mar. 2002), 716–21.
- Filaci, G. et al. 2007. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 179, 7 (Oct. 2007), 4323–34.
- Fong, Y., Tracey, K.J., Moldawer, L.L., Hesse, D.G., Manogue, K.B., Kenney, J.S., Lee, A.T., Kuo, G.C., Allison, A.C. and Lowry, S.F. 1989. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *The Journal of experimental medicine*. 170, 5 (Nov. 1989), 1627–33.
- Friedman, S., Schiano, T. 2004. Cirrhosis and its sequelae. In: *Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Textbook of Medicine. 22nd ed. Philadelphia, Pa.: Saunders.* 936-44.
- Furlan, R., Bergami, A., Lang, R., Brambilla, E., Franciotta, D., Martinelli, V., Comi, G., Panina, P. and Martino, G. 2000. Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4. *Journal of neuroimmunology*. 111, 1-2 (Nov. 2000), 86–92.
- Gabay, C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*. 8, Suppl 2 (2006), S3.
- Gattorno, M. et al. 2008. The pattern of response to anti-interleukin-1 treatment distinguishes two subsets of patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 58, 5 (May 2008), 1505–15.
- Gazzard, B.G., Price, H. and Dawson, A.M. 1986. Detection of hepatic encephalopathy. *Postgraduate medical journal*. 62, 725 (Mar. 1986), 163–6.
- Ge, D. and You, Z. 2008. Expression of interleukin-17RC protein in normal human tissues. *International archives of medicine*. 1, 1 (Jan. 2008), 19.
- Gerok, W. and Häussinger, D. 1984. [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver]. *Die Medizinische Welt*. 35, 1-2 (Jan. 1984), 28–34.
- Ghosh, M., Xu, Y. and Pearce, D. 2015. Cyclic AMP is a key regulator of M1 to M2a phenotypic conversion of microglia in the presence of Th2 cytokines. *Journal of Neuroinflammation*. 13, 1 (Jan. 2016), 1–14.
- Gibson, G.E., Zimber, A., Krook, L., Richardson, E.P. and Visek, W.J. 1974. Brain histology and behavior of mice injected with urease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 33, 2 (Apr. 1974), 201–11.
- Girón-González, J.A.A., Martínez-Sierra, C., Rodríguez-Ramos, C., Macías, M.A., Rendón, P., Díaz, F., Fernández-Gutiérrez, C. and Martín-Herrera, L. 2004. Implication of inflammation-related cytokines in the natural history of liver cirrhosis. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 24, 5 (Oct. 2004), 437–45.
- Goehler, L.E., Gaykema, R.P., Nguyen, K.T., Lee, J.E., Tilders, F.J., Maier, S.F. and Watkins, L.R. 1999. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 19, 7 (Apr. 1999), 2799–806.

- Golden CJ (2001). Stroop Color and Word Test. *Adaptación de TEA Ediciones*.
- González-Amaro, R., Cortés, J., Sánchez-Madrid, F. and Martín, P. 2013. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends in Molecular Medicine*. 19, 10 (Oct. 2013), 625–32.
- Gonzalez-García, I., Zhao, Y., Ju, S., Gu, Q., Liu, L., Kolls, J.K. and Lu, B. 2009. IL-17 signaling-independent central nervous system autoimmunity is negatively regulated by TGF-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 182, 5 (Mar. 2009), 2665–71.
- González-Scarano, F. and Baltuch, G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience*. 22, (Jan. 1999), 219–40.
- Gordon, C. and Wofsy, D. 1990. Effects of recombinant murine tumor necrosis factor-alpha on immune function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 144, 5 (Mar. 1990), 1753–8.
- Gough, S.C. and Simmonds, M.J. 2007. The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. *Current genomics*. 8, 7 (Nov. 2007), 453–65.
- Grant, C.R., Liberal, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. and Longhi, M.S. 2015. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and yet unanswered questions. *Autoimmunity reviews*. 14, 2 (Feb. 2015), 105–16.
- Groeneweg, M., Quero, J.C., De Bruijn, I., Hartmann, I.J., Essink-bot, M.L., Hop, W.C. and Schalm, S.W. 1998. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 28, 1 (Jul. 1998), 45–9.
- Grogan, J. and Ouyang, W. 2012. A role for Th17 cells in the regulation of tertiary lymphoid follicles. *European Journal of Immunology*. 42, 9 (Sep. 2012), 2255–62.
- Gutcher, I. and Becher, B. 2007. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 117, 5 (May. 2007), 1119–27.
- Hammerich, L. and Tacke, F. 2014. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clinical and experimental gastroenterology*. 7, (Jan. 2014), 297–306.
- Hamster, W. and Diener, H.C. 1984. Neuropsychological changes associated with stenoses or occlusions of the carotid arteries. A comparative psychometric study. *European archives of psychiatry and neurological sciences*. 234, 1 (Jan. 1984), 69–73.
- Hardbower, D., Asim, M., Murray-Stewart, T., Casero, R., Verriere, T., Lewis, N., Chaturvedi, R., Piazuelo, B. and Wilson, K. 2016. Arginase 2 deletion leads to enhanced M1 macrophage activation and upregulated polyamine metabolism in response to Helicobacter pylori infection. *Amino Acids*. 48, 10 (Oct. 2016), 2375-88.
- Havenar-Daughton, C. et al. 2016. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113, 10 (Mar. 2016), 2702–7.
- Hilsabeck, R., Perry, W. and Hassanein, T. 2002. Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 35, 2 (Feb. 2002), 440–6.

- Hoebe, K., Janssen, E. and Beutler, B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*. 5, 10 (Oct. 2004), 971–974.
- Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R., Bruford, E., Khodiyar, V., Lush, M., Povey, S., Talbot, C., Wright, M., Wain, H., Trowsdale, J., Ziegler, A. and Beck, S. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*. 5, 12 (Dec. 2004), 889–99.
- Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H., Waisman, A. and Kuhlmann, C. 2010. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *The FASEB Journal*. 24, 4 (Apr. 2010), 1023–34.
- Imaizumi, T., Yoshida, H. and Satoh, K. 2004. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 11, 1 (Jan. 2004), 15–21.
- Ishikawa, S., Akakura, S., Abe, M., Terashima, K., Chijiwa, K., Nishimura, H., Hirose, S. and Shirai, T. 1998. A subset of CD4+ T cells expressing early activation antigen CD69 in murine lupus: possible abnormal regulatory role for cytokine. Imbalance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 161, 3 (Aug. 1998), 1267–73.
- Ivens, S., Kaufer, D., Flores, L.P., Bechmann, I., Zumsteg, D., Tomkins, O., Seiffert, E., Heinemann, U. and Friedman, A. 2007. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain : a journal of neurology*. 130, Pt 2 (Feb. 2007), 535–47.
- Jalan, R., Damink, S., Hayes, P., Deutz, N. and Lee, A. 2004. Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *Journal of Hepatology*. 41, 4 (Oct. 2004), 613–20.
- Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V. and Norenberg, M.D. 2015. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 5, Suppl 1 (Mar. 2015), S21–8.
- Jia, L. and Wu, C. 2014. The biology and functions of Th22 cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 841, (Jan. 2014), 209–30.
- Jiang, R., Tan, Z., Deng, L., Chen, Y., Xia, Y., Gao, Y., Wang, X. and Sun, B. 2011. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 54, 3 (Sep. 2011), 900–9.
- Joebges, E.M., Heidemann, M., Schimke, N., Hecker, H., Ennen, J.C. and Weissenborn, K. 2003. Bradykinesia in minimal hepatic encephalopathy is due to disturbances in movement initiation. *Journal of hepatology*. 38, 3 (Mar. 2003), 273–80.
- Jones, B.A., Beamer, M. and Ahmed, S. 2010. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Molecular interventions*. 10, 5 (Oct. 2010), 263–70.
- Jones, E.A. and Weissenborn, K. 1997. Neurology and the liver. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 63, 3 (Sep. 1997), 279–93.
- Jover, R., Compañy, L., Gutiérrez, A., Lorente, M., Zapater, P., Poveda, M.J.J., Such, J., Pascual, S., Palazón, J.M.M., Carnicer, F., Ferrandis, F. and Pérez-Mateo, M. 2005. Clinical significance of extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology*. 42, 5 (May. 2005), 659–65.

- Jover, R., Compañy, L., Gutiérrez, A., Zapater, P., Pérez-Serra, J., Girona, E., Aparicio, J.R.R. and Pérez-Mateo, M. 2003. Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*. 98, 7 (Jul. 2003), 1599–604.
- Kahle, P., Saal, J.G., Schaudt, K., Zacher, J., Fritz, P. and Pawelec, G. 1992. Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Annals of the rheumatic diseases*. 51, 6 (Jun. 1992), 731–4.
- Kamath, P., Wiesner, R., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T., Kosberg, C., D'Amico, G., Dickson, R. and Kim, R. 2001. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 33, 2 (Feb. 2001), 464–70.
- Kara, E.E., Comerford, I., Fenix, K.A., Bastow, C.R., Gregor, C.E., McKenzie, D.R. and McColl, S.R. 2014. Tailored immune responses: novel effector helper T cell subsets in protective immunity. *PLoS pathogens*. 10, 2 (Feb. 2014), e1003905.
- Khera, T.K., Copland, D.A., Boldison, J., Lait, P.J., Szymkowski, D.E., Dick, A.D. and Nicholson, L.B. 2012. Tumour necrosis factor-mediated macrophage activation in the target organ is critical for clinical manifestation of uveitis. *Clinical and experimental immunology*. 168, 2 (May 2012), 165–77.
- King, C., Tangye, S.G. and Mackay, C.R. 2008. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual review of immunology*. 26, (Jan. 2008), 741–66.
- Kleinewietfeld, M. and Hafler, D. 2014. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunological reviews*. 259, 1 (May. 2014), 231–44.
- Kochanek, K.D., Murphy, S.L., Xu, J. and Tejada-Vera, B. 2016. Deaths: Final Data for 2014. *National vital statistics reports: from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*. 65, 4 (Jun. 2016), 1–122.
- Kolios, G., Valatas, V. and Kouroumalis, E. 2006. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World journal of gastroenterology*. 12, 46 (Dec. 2006), 7413–20.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T.B., Oukka, M. and Kuchroo, V.K. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. 448, 7152 (Jul. 2007), 484–7.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*. 27, 1 (2009), 485–517.
- Krieger, S., Jaus, M., Jansen, O., Theilmann, L., Geissler, M. and Krieger, D. 1996. Neuropsychiatric profile and hyperintense globus pallidus on T1-weighted magnetic resonance images in liver cirrhosis. *Gastroenterology*. 111, 1 (Jul. 1996), 147–55.
- Krzysiek, R., Lefevre, E.A., Bernard, J., Foussat, A., Galanaud, P., Louache, F. and Richard, Y. 2000. Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in human B cells. *Blood*. 96, 7 (Oct. 2000), 2338–45.
- Laflamme, N. and Rivest, S. 2001. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 15, 1 (Jan. 2001), 155–63.

- Lan, R.Y., Salunga, T.L., Tsuneyama, K., Lian, Z.-X.X., Yang, G.-X.X., Hsu, W., Moritoki, Y., Ansari, A.A., Kemper, C., Price, J., Atkinson, J.P., Coppel, R.L. and Gershwin, M.E. 2009. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity*. 32, 1 (Feb. 2009), 43–51.
- Lario, M., Muñoz, L., Ubeda, M., Borrero, M.-J.J., Martínez, J., Monserrat, J., Díaz, D., Alvarez-Mon, M. and Albillos, A. 2013. Defective thymopoiesis and poor peripheral homeostatic replenishment of T-helper cells cause T-cell lymphopenia in cirrhosis. *Journal of hepatology*. 59, 4 (Oct. 2013), 723–30.
- Larsen, F.S., Hansen, B.A. and Blei, A.T. 2000. Intensive care management of patients with acute liver failure with emphasis on systemic hemodynamic instability and cerebral edema: a critical appraisal of pathophysiology. *Canadian journal of gastroenterology. Journal canadien de gastroenterologie*. 14 Suppl D, (Nov. 2000), 105D–111D.
- Laurent, C., Fazilleau, N. and Brousset, P. 2010. A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica*. 95, 3 (Mar. 2010), 356–8.
- Lavoie, J., Layrargues, G.P. and Butterworth, R.F. 1990. Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 11, 5 (May 1990), 874–8
- Le Campion, A., Gagnerault, M.-C.C., Auffray, C., Bécourt, C., Poitrasson-Rivière, M., Lallemand, E., Bienvenu, B., Martin, B., Lepault, F. and Lucas, B. 2009. Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. *Blood*. 114, 9 (Aug. 2009), 1784–93.
- Ledeboer, A., Brevé, J.J., Poole, S., Tilders, F.J. and Van Dam, A.M. 2000. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*. 30, 2 (Apr. 2000), 134–42.
- Lee, W. 2012. Acute Liver Failure. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 33, 01 (Feb. 2012), 36–45.
- Lehnardt, S. 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*. 58, 3 (Feb. 2010), 253–63.
- Liao, F., Rabin, R.L., Smith, C.S., Sharma, G., Nutman, T.B. and Farber, J.M. 1999. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 162, 1 (Jan. 1999), 186–94.
- Liao, W.-T., You, H.-L., Li, C., Chang, J.-G., Chang, S.-J. and Chen, C.-J. 2015. Cyclic GMP-dependent protein kinase II is necessary for macrophage M1 polarization and phagocytosis via toll-like receptor 2. *Journal of Molecular Medicine*. 93, 5 (May. 2015), 523–33.
- Liu, S., Lizée, G., Lou, Y., Liu, C., Overwijk, W.W., Wang, G. and Hwu, P. 2007. IL-21 synergizes with IL-7 to augment expansion and anti-tumor function of cytotoxic T cells. *International immunology*. 19, 10 (Oct. 2007), 1213–21.
- Lockwood, A.H. 2000. "What's in a name?" Improving the care of cirrhotics. *Journal of hepatology*. 32, 5 (May. 2000), 859-61.

- Lockwood, A.H., Murphy, B.W., Donnelly, K.Z., Mahl, T.C. and Perini, S. 1993. Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 18, 5 (Nov. 1993), 1061–8.
- Lodolce, J.P., Burkett, P.R., Koka, R.M., Boone, D.L. and Ma, A. 2002. Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine & growth factor reviews*. 13, 6 (Dec. 2002), 429–39.
- Lu, P., Gonzales, C., Chen, Y., Adedoyin, A., Hummel, M., Kennedy, J.D. and Whiteside, G.T. 2009. CNS penetration of small molecules following local inflammation, widespread systemic inflammation or direct injury to the nervous system. *Life sciences*. 85, 11-12 (Sep. 2009), 450–6.
- Lubberts, E., Schwarzenberger, P., Huang, W., Schurr, J.R., Peschon, J.J., van den Berg, W.B. and Kolls, J.K. 2005. Requirement of IL-17 receptor signaling in radiation-resistant cells in the joint for full progression of destructive synovitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 175, 5 (Sep. 2005), 3360–8.
- Luckheeram, R., Zhou, R., Verma, A. and Xia, B. 2012. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012, (2012), 1–12.
- Ma, L., Qin, J., Ji, H., Zhao, P. and Jiang, Y. 2014. Tfh and plasma cells are correlated with hypergammaglobulinaemia in patients with autoimmune hepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 34, 3 (Mar. 2014), 405–15.
- Maccioni, R.B., Rojo, L.E., Fernandez, J.A. and Kuljis, R.O. 2009. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1153, (Feb. 2009) 240-6.
- MacDonald, H.R., Casanova, J.L., Maryanski, J.L. and Cerottini, J.C. 1993. Oligoclonal expansion of major histocompatibility complex class I-restricted cytolytic T lymphocytes during a primary immune response in vivo: direct monitoring by flow cytometry and polymerase chain reaction. *The Journal of experimental medicine*. 177, 5 (May 1993), 1487–92.
- Mackay, C.R., Marston, W.L. and Dudler, L. 1990. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *The Journal of experimental medicine*. 171, 3 (Mar. 1990), 801–17.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D., B. and Roitt, I., M., 2013. Inmunología. (2013). Saunders. 8th Edition, Elsevier.
- Mali, S.B. 2015. Review of STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) in head and neck cancer. *Oral oncology*. 51, 6 (Jun. 2015), 565–9.
- Maly, K. and Schirmer, M. 2015. The story of CD4+ CD28- T cells revisited: solved or still ongoing? *Journal of immunology research*. 2015, (Jan. 2015), 348746.
- Martin, H., Voss, K., Hufnagl, P., Wack, R. and Wassilew, G. 1987. Morphometric and densitometric investigations of protoplasmic astrocytes and neurons in human hepatic encephalopathy. *Experimental pathology*. 32, 4 (Jan. 1987), 241–50.
- Martín, P. and Sánchez-Madrid, F. 2011. CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses. *Science signaling*. 4, 165 (Jan. 2011), pe14.

Martín, P., Gómez, M., Lamana, A., Cruz-Adalia, A., Ramírez-Huesca, M., Ursa, M., Yáñez-Mo, M. and Sánchez-Madrid, F. 2010. CD69 Association with Jak3/Stat5 Proteins Regulates Th17 Cell Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. 30, 20 (Oct. 2010), 4877–89.

Maruyama, S., Hirayama, C., Horie, Y., Yorozu, K., Maeda, K., Inoue, M., Fujii, Y., Umeki, K. and Koda, M. 2007. Serum immunoglobulins in patients with chronic hepatitis C: a surrogate marker of disease severity and treatment outcome. *Hepato-gastroenterology*. 54, 74 (Mar. 2007), 493–8.

Marzio, R., Mauël, J. and Betz-Corradin, S. 2008. CD69 and Regulation of the Immune Function. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 21, 3 (Aug. 2008), 565–82.

Mechtcheriakov, S., Graziadei, I.W., Rettenbacher, M., Schuster, I., Hinterhuber, H., Vogel, W. and Marksteiner, J. 2005. Diagnostic value of fine motor deficits in patients with low-grade hepatic encephalopathy. *World journal of gastroenterology*. 11, 18 (May. 2005), 2777–80.

Michalak, A. and Butterworth, R.F. 1997. Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. *Metabolic brain disease*. 12, 3 (Sep. 1997), 171–82.

Moens, L. and Tangye, S.G. 2014. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Frontiers in immunology*. 5, (Jan. 2014), 65.

Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M.A., del Olmo, J.A., Urios, A., Rodrigo, J.M. and Felipo, V. 2009. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *Journal of clinical gastroenterology*. 43, 3 (Mar. 2009), 272–9.

Msall, M., Batshaw, M.L., Suss, R., Brusilow, S.W. and Mellits, E.D. 1984. Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. *The New England journal of medicine*. 310, 23 (Jun. 1984), 1500–5.

Netea, Joosten, Latz, Mills, Natoli, Stunnenberg, O'Neill and Xavier 2016. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 352, 6284 (Apr. 2016), aaf1098–aaf1098.

Neuman, M., Maor, Y., Nanau, R., Melzer, E., Mell, H., Opris, M., Cohen, L. and Malnick, S. 2015. Alcoholic Liver Disease: Role of Cytokines. *Biomolecules*. 5, 3 (Aug. 2015), 2023–34.

Nguyen, K., D'Mello, C., Le, T., Urbanski, S. and Swain, M.G. 2012. Regulatory T cells suppress sickness behaviour development without altering liver injury in cholestatic mice. *Journal of hepatology*. 56, 3 (Mar. 2012), 626–31.

Noack, M. and Miossec, P. 2014. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity Reviews*. 13, 6 (Jun. 2014), 668–77.

Norenberg, M.D. 1987. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochemical pathology*. 6, 1-2 (Jan. 1987), 13–33.

Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I. and Oliven, A. 2004. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 24, 2 (Apr. 2004), 110–6.

- Opp, M.R., Smith, E.M. and Hughes, T.K. 1995. Interleukin-10 (cytokine synthesis inhibitory factor) acts in the central nervous system of rats to reduce sleep. *Journal of neuroimmunology*. 60, 1-2 (Jul. 1995), 165–8.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P.P., Wang, G., Qi, C.-F.F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., Morse, H.C., Lipsky, P.E. and Leonard, W.J. 2004. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 173, 9 (Nov. 2004), 5361–71.
- Parkin, J. and Cohen, B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet (London, England)*. 357, 9270 (Jun. 2001), 1777–89.
- Paul, F., Müller, J., Christe, W., Steinmüller, T., Poewe, W. and Wissel, J. 2004. Postural hand tremor before and following liver transplantation and immunosuppression with cyclosporine or tacrolimus in patients without clinical signs of hepatic encephalopathy. *Clinical transplantation*. 18, 4 (Aug. 2004), 429–33.
- Paulissen, S., Hamburg, J., Dankers, W. and Lubberts, E. 2015. The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 74, 1 (Jul. 2015), 43–53.
- Pepys, M.B. and Hirschfield, G.M. 2003. C-reactive protein: a critical update. *The Journal of clinical investigation*. 111, 12 (Jun. 2003), 1805–12.
- Pereira, J.P.P., Kelly, L.M. and Cyster, J.G. 2010. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *International immunology*. 22, 6 (Jun. 2010), 413–9.
- Pieper, J., Johansson, S., Snir, O., Linton, L., Rieck, M., Buckner, J.H., Winqvist, O., van Vollenhoven, R. and Malmström, V. 2014. Peripheral and site-specific CD4(+) CD28(null) T cells from rheumatoid arthritis patients show distinct characteristics. *Scandinavian journal of immunology*. 79, 2 (Feb. 2014), 149–55.
- Prasad, S., Dhiman, R.K., Duseja, A., Chawla, Y.K., Sharma, A. and Agarwal, R. 2007. Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 45, 3 (Mar. 2007), 549–59.
- Pröbstel, A.-K.K., Sanderson, N.S. and Derfuss, T. 2015. B Cells and Autoantibodies in Multiple Sclerosis. *International journal of molecular sciences*. 16, 7 (Jul. 2015), 16576–92.
- Puca, F.M., Antonaci, F., Panella, C., Guglielmi, F.W., Barone, M., Francavilla, A. and Cerutti, R. 1989. Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post-necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Acta neurologica Scandinavica*. 79, 4 (Apr. 1989), 280–7.
- Ram, M., Sherer, Y. and Shoenfeld, Y. 2006. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *Journal of clinical immunology*. 26, 4 (Jul. 2006), 299–307.
- Raveney, B., Copland, D., Calder, C., Dick, A. and Nicholson, L. 2010. TNFR1 signalling is a critical checkpoint for developing macrophages that control of T-cell proliferation. *Immunology*. 131, 3 (Nov. 2010), 340–9.

Rehnström, S., Simert, G., Hansson, J.A., Johnson, G. and Vang, J. 1977. Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 12, 3 (Jan. 1977), 305–11.

Riazi, K., Galic, M.A. and Pittman, Q.J. 2010. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. *Epilepsy research*. 89, 1 (Mar. 2010), 34–42.

Riordan, S. and Williams, R. 1997. Treatment of Hepatic Encephalopathy. *The New England Journal of Medicine*. 337, 7 (Aug. 1997), 473–9.

Rolando, N., Wade, J., Davalos, M., Wendon, J., Philpott-Howard, J. and Williams, R. 2000. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology*. 32, 4 (Oct. 2000), 734–9.

Roman, E., Cordoba, J., Torrens, M., Torras, X., Villanueva, C., Vargas, V., Guarner, C. and Soriano, G. 2011. Minimal hepatic encephalopathy is associated with falls. *The American journal of gastroenterology*. 106, 3, (Mar. 2011), 476–82.

Romero Gómez, M., Córdoba, J., Jover, R., del Olmo, J., Fernández, A., Flavià, M., Compañy, L., Poveda, M.J.J. and Felipo, V. 2006. [Normality tables in the Spanish population for psychometric tests used in the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy]. *Medicina clinica*. 127, 7 (Jul. 2006), 246–9.

Romero-Gómez, M., Córdoba, J., Jover, R., del Olmo, J.A., Ramírez, M., Rey, R., de Madaria, E., Montoliu, C., Nuñez, D., Flavia, M., Compañy, L., Rodrigo, J.M.M. and Felipo, V. 2007. Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 45, 4 (Apr. 2007), 879–85.

Rong, G., Zhou, Y., Xiong, Y., Zhou, L., Geng, H., Jiang, T., Zhu, Y., Lu, H., Zhang, S., Wang, P., Zhang, B. and Zhong, R. 2009. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population. *Clinical and experimental immunology*. 156, 2 (May 2009), 217–25.

Rummel, C., Sachot, C., Poole, S. and Luheshi, G.N. 2006. Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 291, 5 (Nov. 2006), R1316–26.

Rutz, S., Eidenschenk, C. and Ouyang, W. 2013. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological Reviews*. 252, 1 (Mar. 2013), 116–32.

Sabat, R., Ouyang, W. and Wolk, K. 2014. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nature reviews. Drug discovery*. 13, 1 (Jan. 2014), 21–38.

Şahin, T.D.D., Karson, A., Balci, F., Yazir, Y., Bayramgürler, D. and Utkan, T. 2015. TNF-alpha inhibition prevents cognitive decline and maintains hippocampal BDNF levels in the unpredictable chronic mild stress rat model of depression. *Behavioural brain research*. 292, (Oct. 2015), 233–40.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 401, 6754 (Oct. 1999), 708–12.

- Sancho, D., Gómez, M. and Sánchez-Madrid, F. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in immunology*. 26, 3 (Mar. 2005), 136–40.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta*. 1813, 5 (May 2011), 878–88.
- Schoenberger, S.P. 2012. CD69 guides CD4+ T cells to the seat of memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 22 (May 2012), 8358–9.
- Scholz, C., Patton, K.T., Anderson, D.E., Freeman, G.J. and Hafler, D.A. 1998. Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 160, 3 (Feb. 1998), 1532–8.
- Schomerus, H. and Hamster, W. 1998. Neuropsychological aspects of portal-systemic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. 13, 4 (Dec. 1998), 361–77.
- Schomerus, H., Hamster, W., Blunck, H., Reinhard, U., Mayer, K. and Dolle, W. 1981. Latent portasystemic encephalopathy. I. Nature of cerebral functional defects and their effect on fitness to drive. *Digestive diseases and sciences*. 26, 7, (Jul. 1981), 622-30.
- Schuppan, D. and Afdhal, N.H. 2008. Liver cirrhosis. *Lancet (London, England)*. 371, 9615 (Mar. 2008), 838–51.
- Schutysse, E., Struyf, S. and Van Damme, J. 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & growth factor reviews*. 14, 5 (Oct. 2003), 409–26.
- Seiffert, E., Dreier, J., Ivens, S., Bechmann, I., Tomkins, O., Heinemann, U. and Friedman, A. 2004. Lasting Blood-Brain Barrier Disruption Induces Epileptic Focus in the Rat Somatosensory Cortex. *The Journal of Neuroscience*. 24, 36 (Sep. 2004), 7829–36.
- Seiler, N. 1993. Is ammonia a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? *Neurochemical research*. 18, 3, (Mar. 1993), 235-245.
- Seiler, N. 2002. Ammonia and Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*. 41, 2-3, (Aug-Sep. 2002), 189-207.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E. and Aloisi, F. 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 14, 2 (Apr. 2004), 164–74
- Shawcross, D. and Wendon, J. 2012. The neurological manifestations of acute liver failure. *Neurochemistry International*. 60, 7 (Jun. 2012), 662–71.
- Shawcross, D.L., Davies, N.A., Williams, R. and Jalan, R. 2004. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *Journal of hepatology*. 40, 2 (Feb. 2004), 247–54
- Shawcross, D.L., Sharifi, Canavan, J.B., Yeoman, A.D., Abeles, R.D., Taylor, N.J., Auzinger, Bernal and Wendon, J.A. 2011. Infection and systemic inflammation, not ammonia, are associated with Grade 3/4 hepatic encephalopathy, but not mortality in cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 54, 4 (Apr. 2011), 640–649.

- Shen, P. and Fillatreau, S. 2015. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nature Reviews Immunology*. 15, 7 (Jul. 2015), 441–51.
- Sherlock, S., Summerskill, W.H., White, L.P. and Phear, E.A. 1954. Portal-systemic encephalopathy; neurological complications of liver disease. *Lancet (London, England)*. 267, 6836 (Sep. 1954), 454–7.
- Shi, C. and Pamer, E. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 11, 11 (Oct. 2011), 762–74.
- Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Zehentmeier, S., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, D.J., Radbruch, A. and Nakayama, T. 2012. Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 19 (May 2012), 7409–14.
- Shiow, L.R., Rosen, D.B., Brdicková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L.L., Cyster, J.G. and Matloubian, M. 2006. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*. 440, 7083 (Mar. 2006), 540–4.
- Simard, A.R. and Rivest, S. 2005. Do pathogen exposure and innate immunity cause brain diseases? *Neurological research*. 27, 7 (Oct. 2005), 717–25.
- Simmonds, M.J., Howson, J.M.M., Heward, J.M., Cordell, H.J., Foxall, H., Carr-Smith, J., Gibson, S.M., Walker, N., Tomer, Y., Franklyn, J.A., Todd, J.A. and Gough, S.C. 2005. Regression mapping of association between the human leukocyte antigen region and Graves disease. *American journal of human genetics*. 76, 1 (Jan. 2005), 157–63.
- Sipeki, N. 2014. Immune dysfunction in cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 20, 10 (Mar. 2014), 2564.
- Słowik, A., Ciećko-Michalska, I., Bogdał, J. and Szczudlik, A. 2001. [The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy]. *Przegląd lekarski*. 58, 12 (Jan. 2001), 1059–62.
- Sofroniew, M. and Vinters, H. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 119, 1 (Jan. 2010), 7–35.
- Solitare, G. 1972. The astrocyte in liver disease. *The Lancet*. 299, 7745 (Feb. 1972), 319–20.
- Spahr, L., Butterworth, R.F., Fontaine, S., Bui, L., Therrien, G., Milette, P.C., Lebrun, L.H., Zayed, J., Leblanc, A. and Pomier-Layrargues, G. 1996. Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 24, 5 (Nov. 1996), 1116–20.
- Stobbe-Maicherski, N., Wolff, S., Wolff, C., Abel, J., Sydlik, U., Frauenstein, K. and Haarmann-Stemann, T. 2013. The interleukin-6-type cytokine oncostatin M induces aryl hydrocarbon receptor expression in a STAT3-dependent manner in human HepG2 hepatoma cells. *FEBS Journal*. 280, 24 (Dec. 2013), 6681–90.
- Strbian, Durukan, Pitkonen, Marinkovic, Tatlisumak, Pedrono, Abo-Ramadan and Tatlisumak 2008. The blood–brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 153, 1 (Apr. 2008), 175–181.

Streetz, K.L., Tacke, F., Leifeld, L., Wüstefeld, T., Graw, A., Klein, C., Kamino, K., Spengler, U., Kreipe, H., Kubicka, S., Müller, W., Manns, M.P. and Trautwein, C. 2003. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 38, 1 (Jul. 2003), 218–29.

Stroop, J.R. 1935. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology*. 18, 6 (Dec. 1935), 643–62.

Such, J., Francés, R., Muñoz, C., Zapater, P., Casellas, J.A., Cifuentes, A., Rodríguez-Valera, F., Pascual, S., Sola-Vera, J., Carnicer, F., Uceda, F., Palazón, J.M.M. and Pérez-Mateo, M. 2002. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 36, 1 (Jul. 2002), 135–41.

Suto, A., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Hirose, K., Watanabe, N., Yokote, K., Saito, Y., Nakayama, T., Grusby, M.J., Iwamoto, I. and Nakajima, H. 2008. Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine*. 205, 6 (Jun. 2008), 1369–79.

Szekely, C.A., Thorne, J.E., Zandi, P.P., Ek, M., Messias, E., Breitner, J.C. and Goodman, S.N. 2004. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology*. 23, 4, (Jul-Aug. 2004), 159–69.

Tanaka, S., Okamoto, Y., Yamazaki, M., Mitani, N., Nakajima, Y. and Fukui, H. 2007. Significance of hyperglobulinemia in severe chronic liver diseases—with special reference to the correlation between serum globulin/IgG level and ICG clearance. *Hepato-gastroenterology*. 54, 80 (Dec. 2007), 2301–5.

Tao, Y., Zhang, X., Zivadinov, R., Dwyer, M.G., Kennedy, C., Bergsland, N., Ramasamy, D., Durfee, J., Hojnacki, D., Hayward, B., Dangond, F., Weinstock-Guttman, B. and Markovic-Plese, S. 2015. Immunologic and MRI markers of the therapeutic effect of IFN- β -1a in relapsing-remitting MS. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2, 6 (Dec. 2015), e176.

Tewes, U. 1991. HAWIE-R. Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene. *Revision, Verlag Hans Huber. Bern-Stuttgart-Toronto*.

Thompson, K., Maltby, J., Fallowfield, J., McAulay, M., Millward-Sadler, H. and Sheron, N. 1998. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 28, 6 (Dec. 1998), 1597–606.

Thorbecke, G.J., Amin, A.R. and Tsiagbe, V.K. 1994. Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 8, 11 (Aug. 1994), 832–40.

Thorsby, E. and Lie, B.A. 2005. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transplant immunology*. 14, 3-4 (Aug. 2005), 175–82.

Tian, T., Yu, S. and Ma, D. 2013. Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases. *Expert opinion on therapeutic targets*. 17, 2 (Feb. 2013), 113–25.

Timmermann, L., Butz, M., Gross, J., Kircheis, G., Häussinger, D. and Schnitzler, A. 2005. Neural synchronization in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. 20, 4 (Dec. 2005), 337–46.

Timmermann, L., Gross, J., Butz, M., Kircheis, G., Haussinger, D. and Schnitzler, A. 2004. Pathological oscillatory coupling within the human motor system in different tremor syndromes

as revealed by magnetoencephalography. *Neurology & clinical neurophysiology: NCN*. 2004, (Jan. 2004), 26.

Timmermann, L., Gross, J., Kircheis, G., Häussinger, D. and Schnitzler, A. 2002. Cortical origin of mini-asterixis in hepatic encephalopathy. *Neurology*. 58, 2 (Jan. 2002), 295–8.

Todd, D.J., Greiner, D.L., Rossini, A.A., Mordes, J.P. and Bortell, R. 2001. An atypical population of NK cells that spontaneously secrete IFN-gamma and IL-4 is present in the intraepithelial lymphoid compartment of the rat. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 167, 7 (Oct. 2001), 3600–9

Tomkins, O., Friedman, O., Ivens, S., Reiffurth, C., Major, S., Dreier, J.P., Heinemann, U. and Friedman, A. 2007. Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. *Neurobiology of disease*. 25, 2 (Feb. 2007), 367–77.

Tracey, K.J., Fong, Y., Hesse, D.G., Manogue, K.R., Lee, A.T., Kuo, G.C., Lowry, S.F. and Cerami, A. 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 330, 6149 (Jan. 1987), 662–4.

Tripathi, S.K. and Lahesmaa, R. 2014. Transcriptional and epigenetic regulation of T-helper lineage specification. *Immunological reviews*. 261, 1 (Sep. 2014), 62–83.

Tulunay, A., Yavuz, S., Direskeneli, H. and Eksioğlu-Demiralp, E. 2008. CD8+CD28-, suppressive T cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 17, 7 (Jul. 2008), 630–7.

Uribe, M., Márquez, M.A., García-Ramos, G., Escobedo, V., Murillo, H., Guevara, L. and Lisker, R. 1980. Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with lactose in lactase-deficient patients. *Digestive diseases and sciences*. 25, 12 (Dec. 1980), 924–8.

Vallejo, A.N., Weyand, C.M. and Goronzy, J.J.J. 2004. T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends in molecular medicine*. 10, 3 (Mar. 2004), 119–24.

Vallièrès, F. and Girard, D. 2013. IL-21 enhances phagocytosis in mononuclear phagocyte cells: identification of spleen tyrosine kinase as a novel molecular target of IL-21. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 190, 6 (Mar. 2013), 2904–12.

Van Dam, A.M., Poole, S., Schultzberg, M., Zavala, F. and Tilders, F.J. 1998. Effects of peripheral administration of LPS on the expression of immunoreactive interleukin-1 alpha, beta, and receptor antagonist in rat brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 840, (May 1998), 128–38.

Varma, T.K., Toliver-Kinsky, T.E., Lin, C.Y., Koutrouvelis, A.P., Nichols, J.E. and Sherwood, E.R. 2001. Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice. *Infection and immunity*. 69, 9 (Sep. 2001), 5249–63.

Wan, C.-K.K., Andraski, A.B., Spolski, R., Li, P., Kazemian, M., Oh, J., Samsel, L., Swanson, P.A., McGavern, D.B., Sampaio, E.P., Freeman, A.F., Milner, J.D., Holland, S.M. and Leonard, W.J. 2015. Opposing roles of STAT1 and STAT3 in IL-21 function in CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112, 30 (Jul. 2015), 9394–9.

- Washington, M.K. 2007. Autoimmune liver disease: overlap and outliers. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 20 Suppl 1, (Feb. 2007), S15–30.
- Watt, K., Uhanova, J., Gong, Y., Kaita, K., Doucette, K., Pettigrew, N. and Minuk, G.Y. 2004. Serum immunoglobulins predict the extent of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of viral hepatitis.* 11, 3 (May 2004), 251–6.
- Wegener, M., Neuhausen, P., Börsch, G. and Ricken, D. 1986. [Significance of serum immunoglobulins for the diagnosis of alcohol-induced liver diseases]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946).* 111, 45 (Nov. 1986), 1716–20
- Wei, L., Laurence, A., Elias, K. and O’Shea, J. 2007. IL-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives IL-17 Production in a STAT3-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry.* 282, 48 (Nov. 2007), 34605–34610.
- Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J. and Ahl, B. 2005b. Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS (London, England).* 19 Suppl 3, (Oct. 2005), S93–8.
- Weissenborn, K., Ennen, J.C., Schomerus, H., Rückert, N. and Hecker, H. 2001. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology.* 34, 5 (May 2001), 768–73.
- Weissenborn, K., Giewekemeyer, K., Heidenreich, S., Bokemeyer, M., Berding, G. and Ahl, B. 2005a. Attention, Memory, and Cognitive Function in Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease.* 20, 4 (Dec. 2005), 359–367.
- Weissenborn, K., Heidenreich, S., Giewekemeyer, K., Rückert, N. and Hecker, H. 2003. Memory function in early hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology.* 39, 3 (Sep. 2003), 320–5.
- Weng, N.-P.P., Akbar, A.N. and Goronzy, J. 2009. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends in immunology.* 30, 7 (Jul. 2009), 306–12.
- Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D.D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.-D.D., Sterry, W. and Sabat, R. 2006. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European journal of immunology.* 36, 5 (May 2006), 1309–23.
- Xu, Y., Xu, Y., Wang, Y., Wang, Y., He, L., Jiang, Z., Huang, Z., Liao, H., Li, J., Saavedra, J.M., Zhang, L. and Pang, T. 2015. Telmisartan prevention of LPS-induced microglia activation involves M2 microglia polarization via CaMKK β -dependent AMPK activation. *Brain, behavior, and immunity.* 50, (Nov. 2015), 298–313.
- Yamane, H. and Paul, W.E. 2012. Cytokines of the $\gamma(c)$ family control CD4+ T cell differentiation and function. *Nature immunology.* 13, 11 (Nov. 2012), 1037–44.
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, L., Fan, F., Zhu, L., Li, Z., Ruan, X., Huang, H., Wang, Z., Huang, Z., Huang, Y., Yan, X. and Chen, Y. 2010. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *Journal of hepatology.* 53, 2 (Aug. 2010), 339–47.

- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S. and Dong, C. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry*. 282, 13 (Mar. 2007), 9358–63.
- Yeh, S.-H.H. and Chen, P.-J.J. 2010. Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology*. 78 Suppl 1, (Jul. 2010), 172–9.
- Yen, C.L. and Liaw, Y.F. 1990. Somatosensory evoked potentials and number connection test in the detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Hepato-gastroenterology*. 37, 3 (Jun. 1990), 332–4.
- Yokota, S., Geppert, T.D. and Lipsky, P.E. 1988. Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 140, 2 (Jan. 1988), 531–6.
- Yonkers, N.L., Sieg, S., Rodriguez, B. and Anthony, D.D. 2011. Reduced naive CD4 T cell numbers and impaired induction of CD27 in response to T cell receptor stimulation reflect a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases*. 203, 5 (Mar. 2011), 635–45.
- Zhou, L., Lopes, J., Chong, M., Ivanov, I., Min, R., Victora, G., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y., Rudensky, A., Ziegler, S. and Littman, D. 2008. TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature*. 453, 7192 (May. 2008), 236–40.
- Zhu, J. and Paul, W.E. 2010. Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological reviews*. 238, 1 (Nov. 2010), 247–62.
- Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W.E. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations *Annual review of immunology*. 28, (Jan. 2010), 445–89.
- Ziegler-Heitbrock, L. et al. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 116, 16 (Oct. 2010), e74–80.