



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

2021

María Pilar Ballester Ferré

TESIS DOCTORAL

TESIS DOCTORAL



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA (U·V)

Facultat de Medicina i Odontologia

Programa de Doctorado en MEDICINA

Caracterización del deterioro neurológico y  
la respuesta al tratamiento con rifaximina  
en pacientes con encefalopatía hepática  
mínima

TESIS DOCTORAL

Presentada por:  
María Pilar Ballester Ferré

Dirigida por:  
Dra. Carmina Montoliu Félix  
Dr. Miguel Ángel Serra Desfilis  
Dra. María Desamparados Escudero Garcia

Valencia, Enero 2021



# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia



**Programa de Doctorado en MEDICINA**

Línea de Investigación: Medicina del Aparato Digestivo

## **Caracterización del deterioro neurológico y la respuesta al tratamiento con rifaximina en pacientes con encefalopatía hepática mínima**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

**María Pilar Ballester Ferré**

Dirigida por:

**Dra. Carmina Montoliu Felix**

**Dr. Miguel Ángel Serra Desfilis**

**Dra. María Desamparados Escudero Garcia**

Valencia, Enero de 2021



---

**INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS**

---

**Director (es)/ Codirector (es):**

1.- Apellidos y nombre: MONTOLIU FÉLIX, CARMINA N.I.F. 24329513K, Departamento/Instituto: Patología, Centro: Facultat de Medicina i Odontologia

2.- Apellidos y nombre: SERRADEFILIS, MIGUELANGEL N.I.F. 19.504.805T, Departamento/ Instituto: Medicina, Centro: Facultat de Medicina i Odontologia

3.- Apellidos y nombre: ESCUDERO GARCÍA, MARÍA DESAMPARADOS N.I.F. 22.665.036P, Departamento/Instituto: Medicina, Centro: Facultat de Medicina i Odontologia

Directores/as, respectivamente, de la tesis doctoral: "Caracterización del deterioro neurológico y la respuesta al tratamiento con rifaximina en pacientes con encefalopatía hepática mínima"

de D/Dña. MARIA PILAR BALLESTER FERRÉ,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/ 2011) en Medicina de la Universitat de Valencia, emiten informe FAVORABLE para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 8 de enero de 2021

Fdo.: Carmina Montoliu Félix

Fdo. : Miguel Ángel Serra Desfilis

Fdo.: M Desamparados Escudero García



Director/a



Director/a



Director/a

**ESCUELA DOCTORAL  
UNIVERSITAT DE VALENCIA**



# Agradecimientos

Esta tesis va dedicada a todos aquellos pacientes que, gracias a su colaboración, mantienen activa nuestra motivación, permiten ampliar el conocimiento científico y hacen que todo el esfuerzo tenga su recompensa. También a todos los voluntarios sanos que participan como controles, su papel en la investigación es clave.

Quería agradecer a mis directores de tesis la oportunidad de introducirme y formarme en el mundo de la investigación clínica, básica y traslacional. Me siento afortunada porque gracias a su ejemplo, empeño y dedicación, la investigación se ha convertido en una de mis pasiones.

Sin embargo, el desarrollo de esta tesis no habría sido posible sin la ayuda de mis compañeros del Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Clínico Universitario de Valencia con los que comparto labor asistencial. Un equipo caracterizado por la unión y solidaridad sin dejar de lado la profesionalidad.

Y el equipo del laboratorio de Deterioro Neurológico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, formado por gente emprendedora y con ganas de compartir conocimiento.

En último lugar, a título personal, agradecer a mis padres su apoyo a lo largo de mi carrera profesional. Ellos han sido mi sustento, han compartido mis logros y alegrías y han sufrido mis desilusiones. Por eso y mucho más, merecen todas las palabras de gratitud. Y a mi pareja, por vivir cada una de las líneas de esta tesis doctoral a mi lado.





*«Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.» (Marie Curie)*



## **Palabras clave**

Cirrosis hepática, encefalopatía hepática mínima, rifaximina.

## **Abreviaturas**

ACLF – fallo hepático agudo sobre crónico

ADN – ácido desoxirribonucleico

Alb – albúmina

ALT – alanina aminotransferasa

ARN – ácido ribonucleico

AST – aspartato aminotransferasa

AUROC – área bajo la curva ROC

BBNC – beta-bloqueantes no cardioselectivos

BHE – barrera hematoencefálica

Bil – bilirrubina

BSA – albúmina de suero bovino

C – comisiones

Co – colores

CHC – carcinoma hepatocelular

Col – colesterol

CON – índice de concentración

CPA – células presentadoras de antígeno

DAMPs – patrones moleculares asociados al daño

DL – dislipemia

DM – diabetes mellitus

EEM – error estándar de la media

EH – encefalopatía hepática

EHC – encefalopatía hepática clínica

EHE – encefalopatía hepática encubierta

EHGNA – enfermedad hepática grasa no alcohólica

EHM – encefalopatía hepática mínima

FA – fosfatasa alcalina

GABA – ácido gamma-aminobutírico

GGT – gamma glutamil transferasa

Hgb – hemoglobina

HTA – hipertensión arterial

HTP – hipertensión portal

IBP – inhibidores de la bomba de protones

IC95 – intervalo de confianza del 95%

IFN $\gamma$  – interferón gamma

Ig – inmunoglobulina

IL – interleucina

IL-1ra – receptor del antagonista de la IL-1

INR – ratio internacional normalizado

ISHEN – Sociedad Internacional para la Encefalopatía Hepática y el Metabolismo del

Nitrógeno

Leuc – leucocitos

MELD – *model for end stage liver disease*

MHC – complejo mayor de histocompatibilidad

NK – natural killer

O – omisiones

OR – razón de probabilidad

P – palabras

PAMPs – patrones moleculares asociados a patógeno

PBE – peritonitis bacteriana espontánea

PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PC – palabras-colores

PHES – *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*

Plaq – plaquetas

Prot – proteínas

qPCR – PCR cuantitativa

Resp – respondedor

RM – resonancia magnética

ROC – *receiver operating characteristic*

SDS – dodecilsulfato sódico  
SHR – síndrome hepatorenal  
SNC – sistema nervioso central  
TA – total de aciertos  
TC – tomografía computarizada  
TCN-A – test de conexión numérica A  
TCN-B – test de conexión numérica B  
TCR – receptor de linfocitos T  
TFG $\beta$  – factor de crecimiento transformador beta  
Tg – triglicéridos  
Thf – linfocitos T helper foliculares  
TIPS – *transyugular intrahepatic portosystemic shunt*  
TLQ – test de la línea quebrada  
TNF $\alpha$  – factor de necrosis tumoral alfa  
TOT – efectividad total de la prueba  
TP – tiempo de protrombina  
TPS – test de puntos seriados  
TR – total de respuestas  
Treg – linfocitos T reguladores  
TSD – test de símbolos y dígitos  
VHB – virus de la hepatitis B  
VHC – virus de la hepatitis C



## Resumen

**Introducción:** La encefalopatía hepática mínima (EHM) es una entidad frecuente, poco diagnosticada, que condiciona el pronóstico en pacientes con cirrosis hepática. La respuesta inflamatoria tiene un papel esencial en su patogenia pero no está bien definido. La rifaximina mejora las alteraciones neurológicas pero su mecanismo de acción es desconocido.

**Objetivos:** caracterizar las alteraciones cognitivas y motoras asociadas a la EHM, diagnosticada por el PHES, mediante test psicométricos específicos, estudiar los mecanismos inflamatorios asociados a las alteraciones neurológicas y analizar el efecto de la rifaximina.

**Material y métodos:** estudio prospectivo de una cohorte de pacientes con cirrosis controlados en los Hospitales Clínico y Arnau de Vilanova de Valencia. Se excluyeron pacientes con enfermedad neurológica o psiquiátrica, episodios de encefalopatía hepática previos, consumo de alcohol o drogas, infección o hemorragia digestiva recientes, tratamiento antiviral activo, TIPS o hepatocarcinoma. Se incluyó un grupo control con los criterios de exclusión aplicables. Se diagnosticó la EHM en base al PHES. Se recogieron variables clínicas, se realizaron test psicométricos, se midieron niveles de amonio y se estudió el inmunofenotipo, el nivel de citocinas, los factores de transcripción y los niveles de IgG en sangre mediante citometría de flujo, ELISA, PCR cuantitativa y *Western Blot*, respectivamente. Los pacientes con EHM recibieron rifaximina y se evaluó la respuesta con el PHES a los 3 meses. Se repitieron los test psicométricos y los análisis de sangre y se compararon en función de la respuesta al tratamiento.

**Resultados:** La EHM en base al PHES, se relacionó con la cirrosis descompensada con ascitis y/o peritonitis bacteriana espontánea, los diuréticos, la hiponatremia y plaquetopenia. Los test psicométricos detectaron alteraciones neurológicas en pacientes sin EHM por el PHES. Los niveles de amonio presentaron una correlación moderada con el PHES. Los pacientes con EHM asociaron una alteración inflamatoria caracterizada por aumento en los niveles de linfocitos T autorreactivos y activados, IL-22, factor AHR e IgG. La rifaximina revertió la EHM en un 66% de pacientes con una mejoría de las alteraciones neurológicas asociada a una normalización de los parámetros inflamatorios con una peor respuesta en pacientes con alteraciones metabólicas y ausencia de elevación de linfocitos T activados al inicio del tratamiento.

**Conclusiones:** Una gran proporción de pacientes con cirrosis presenta alteraciones neurológicas detectadas con test psicométricos específicos e infradiagnosticadas por el PHES, asociadas a un estado de inflamación sistémica que podría ser revertido con la rifaximina.





# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1. CIRROSIS HEPÁTICA.....	3
1.1. Definición.....	3
1.2. Epidemiología.....	3
1.3. Etiología.....	5
1.4. Diagnóstico.....	6
1.5. Patogenia.....	9
2. ENCEFALOPATIA HEPÁTICA.....	13
2.1. Definición.....	13
2.2. Epidemiología.....	13
2.3. Manifestaciones clínicas.....	14
2.3.1. Clasificación.....	16
2.4. Diagnóstico.....	17
2.4.1. Encefalopatía hepática clínica.....	17
2.4.2. Encefalopatía hepática mínima.....	19
2.5. Patogenia.....	20
2.5.1. Hiperamonemia.....	20
2.5.2. Eje intestino-hígado-cerebro: microbiota intestinal.....	22
2.5.3. Alteraciones en la neurotransmisión.....	22
2.5.4. Respuesta inflamatoria sistémica.....	23
2.6. Tratamiento.....	24
2.6.1. Encefalopatía hepática clínica.....	24
2.6.2. Encefalopatía hepática mínima.....	29
3. SISTEMA INMUNITARIO Y RESPUESTA INFLAMATORIA.....	30
3.1. Mecanismos generales.....	30
3.2. Células del sistema inmunitario.....	30
3.2.1. Linfocitos B: respuesta humoral.....	32
3.2.2. Linfocitos T: respuesta celular.....	33
3.2.3. Monocitos y macrófagos.....	39
3.3. Factores implicados en la respuesta inflamatoria.....	40
3.3.1. Marcadores de inflamación: CD69.....	40

3.3.2.	Mediadores de la inflamación: citocinas.....	40
3.4.	Sistema inmunitario cerebral.....	44
4.	SISTEMA INMUNITARIO EN LA CIRROSIS HEPÁTICA.....	47
4.1.	Contribución del hígado a la homeostasis del sistema inmunitario...47	
4.2.	Síndrome de disfunción inmunitaria asociada a la cirrosis.....	47
4.2.1.	Inmunodeficiencia inducida por la cirrosis.....	48
4.2.2.	Inflamación sistémica inducida por la cirrosis.....	49
<b>II.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>57</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>V.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
1.	DISEÑO.....	65
2.	POBLACIÓN.....	65
3.	OBTENCIÓN DE DATOS.....	67
4.	DIAGNÓSTICO DE EHM.....	68
5.	EVALUACIÓN DE OTRAS ALTERACIONES COGNITIVAS.....	70
5.1.	Test de Stroop de colores y palabras.....	70
5.2.	Test d2.....	72
5.3.	Test de claves oral.....	73
5.4.	Test de dígitos oral.....	74
5.5.	Test de letras y números oral.....	74
6.	EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES MOTORAS.....	76
6.1.	Test de coordinación bimanual.....	76
6.2.	Test de coordinación visomotora.....	76
7.	DETERMINACIÓN DE AMONIO EN SANGRE.....	77
8.	ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES INMUNITARIAS.....	79
8.1.	Estudio del inmunofenotipo.....	79
8.1.1.	Estudio cuantitativo de poblaciones leucocitarias.....	79
8.1.2.	Estudio de monocitos.....	81
8.1.3.	Estudio de linfocitos T autorreactivos.....	81
8.1.4.	Estudio de marcadores de activación.....	82
8.2.	Determinación de citocinas en suero.....	82
8.3.	Análisis de factores de transcripción.....	84

8.3.1.	Aislamiento de células mononucleares.....	84
8.3.2.	Aislamiento del ARN.....	86
8.3.3.	Retro-transcripción del ARN.....	86
8.3.4.	PCR cuantitativa.....	87
8.4.	Determinación de niveles de IgG.....	88
9.	TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA.....	91
10.	ANÁLISIS DE DATOS.....	92
11.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	94
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
1.	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	97
2.	EVALUACIÓN DE FACTORES CLÍNICOS Y ANALÍTICOS.....	98
3.	CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES NEUROLÓGICAS	
3.1.	Funciones cognitivas.....	102
3.2.	Funciones motoras.....	109
4.	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE AMONIO EN SANGRE.....	112
5.	ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES INMUNITARIAS.....	116
5.1.	Estudio del inmunofenotipo.....	116
5.2.	Determinación de citocinas en suero.....	116
5.3.	Análisis de factores de transcripción.....	123
5.4.	Determinación de niveles de IgG.....	125
6.	EVOLUCIÓN CLÍNICA Y ANALÍTICA.....	126
7.	EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA.....	129
7.1.	Factores clínicos y analíticos.....	130
7.2.	Funciones cognitivas y motoras.....	135
7.3.	Niveles de amonio en sangre.....	140
7.4.	Alteraciones inmunitarias.....	141
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
1.	GENERALIDADES.....	151
2.	FACTORES CLÍNICOS Y ANALÍTICOS.....	151
3.	ALTERACIONES NEUROLÓGICAS.....	154
4.	NIVELES DE AMONIO EN SANGRE.....	156
5.	ALTERACIONES INMUNITARIAS.....	157
6.	EVOLUCIÓN CLÍNICA Y ANALÍTICA.....	159

7. TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA.....	160
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>165</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>169</b>
<b>X. TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>193</b>
1. TABLAS.....	193
2. FIGURAS.....	195
<b>XI. ANEXOS.....</b>	<b>203</b>
1. ANEXO 1.....	203
2. ANEXO 2.....	204

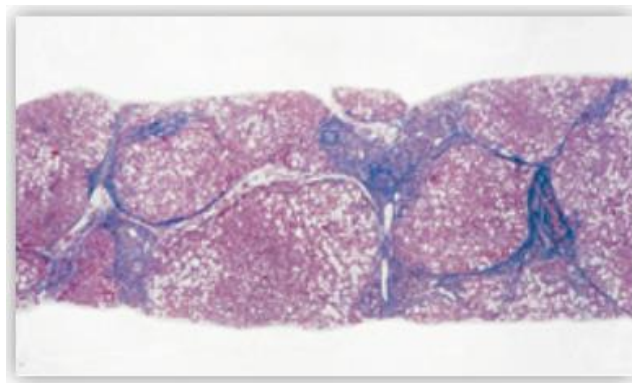
# **I. INTRODUCCIÓN**



# 1. CIRROSIS HEPÁTICA

## 1.1. Definición

La cirrosis hepática es el estadio final de un proceso de fibrosis progresiva, en respuesta a un daño hepático crónico, que da lugar a la distorsión de la arquitectura lobular con la formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración (Figura 1) (1).

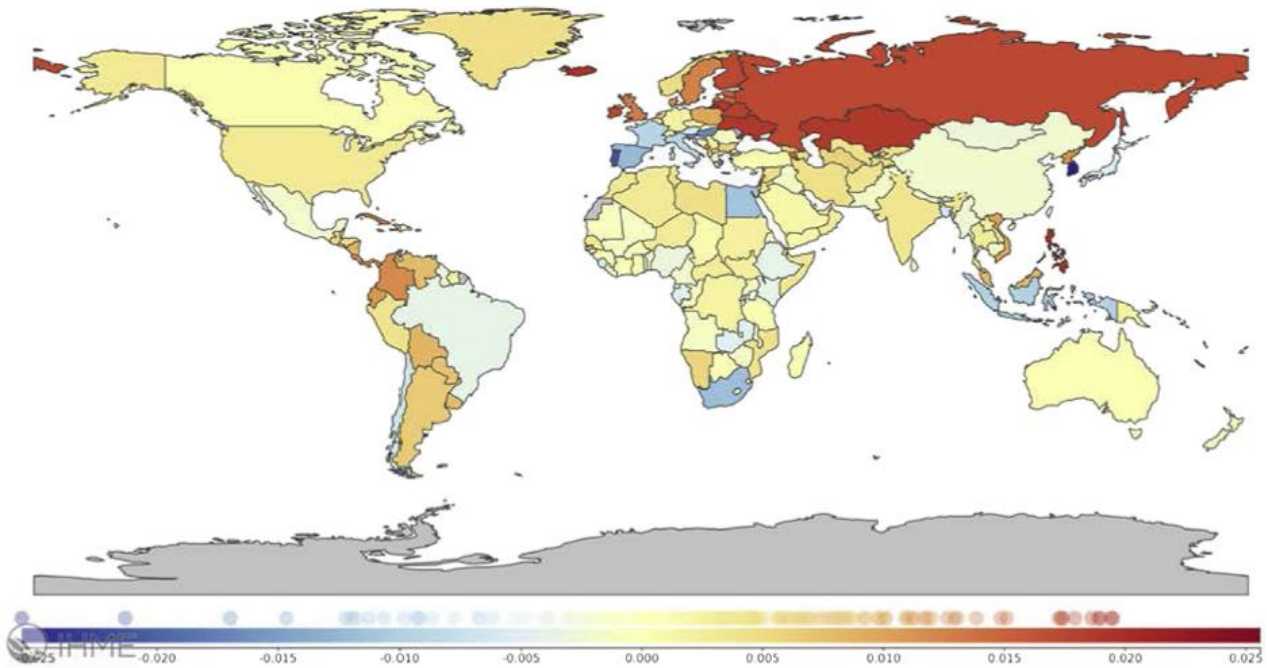


**Figura 1.** Histología de la cirrosis hepática: septos fibrosos y nódulos de regeneración (tinción tricrómica de Masson) (1).

## 1.2. Epidemiología

La cirrosis hepática supone una patología de creciente morbimortalidad en los países más desarrollados.

Su prevalencia es desconocida. Se estima que en Estados Unidos está entre el 0,15% y el 0,27% (2-3). En Europa, la prevalencia de hepatopatía crónica en el año 2016 en los 35 países, osciló entre 447 (Islandia) a 1100 (Rumanía) casos por 100.000 habitantes, con una media de 833. La prevalencia por etiologías fue de 312 por 100.000 habitantes para el consumo de alcohol, 212 por 100.000 habitantes para la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), 130 por 100.000 habitantes para la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) y 116 por 100.000 habitantes para otras causas (4-5) (Figura 2).



**Figura 2.** Cambio porcentual estandarizado por edad en la incidencia de cirrosis hepática y otras enfermedades hepáticas crónicas desde 1990 a 2017 (casos nuevos por 100.000 habitantes).

Supone la cuarta causa más frecuente de muerte en adultos, con un total de 8 millones de muertes por año en Europa (4). Las tasas de mortalidad, según los datos de los registros de certificación de defunción recopilados por la Organización Mundial de la Salud, se correlacionan con los datos de prevalencia con una tasa de 36 muertes por cada 100.000 habitantes en Rumanía y por debajo de 10 casos por 100.000 habitantes en Islandia y Noruega (6).

En España, de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística (7), el número de defunciones atribuidas a la cirrosis se ha reducido discretamente, pasando de unos 6000 casos en el año 2000 a unos 5400 en el año 2018.



### **1.3. Etiología**

La etiología de la cirrosis hepática varía geográficamente.

Las causas más frecuentes en los países desarrollados son la infección por el VHC, el consumo de alcohol y la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) (8-9). Estas tres juntas, suponían el 80% de los pacientes en lista de espera de trasplante en Estados Unidos entre el 2004 y el 2013 (10). Además, la EHGNA se ha convertido en una de las principales causas de hepatopatía crónica en las últimas décadas en los países occidentales, donde presenta una prevalencia de hasta el 30% en la población general (11-12).

La infección por el VHB es la primera causa de cirrosis hepática en los países subdesarrollados (13).

Otras causas de cirrosis incluyen la hepatitis autoinmune, la colangitis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, el déficit de alfa-1-antitripsina, el síndrome de Budd-Quiri, la toxicidad por fármacos o la cirrosis criptogénica, definida como la cirrosis hepática de etiología incierta (1, 14-17).

## **1.4. Diagnóstico**

El diagnóstico de la cirrosis hepática se establece a través de una biopsia hepática con fibrosis y nódulos de regeneración o por la combinación de datos clínicos, analíticos y radiológicos característicos de esta patología.

Respecto a la clínica, la mayoría de las cirrosis se caracterizan por una fase asintomática o con síntomas inespecíficos como anorexia, pérdida de peso, debilidad o fatiga, denominada cirrosis compensada; seguida de una fase sintomática y rápidamente progresiva, denominada cirrosis descompensada (18).

En la fase de cirrosis compensada, el diagnóstico se realiza generalmente de forma incidental ante la presencia de una elevación leve o moderada de las transaminasas o la gamma glutamil transferasa (GGT) junto con un aumento del tamaño del hígado o del bazo en la exploración física. Por el contrario, los pacientes con cirrosis descompensada presentan un amplio abanico de signos y síntomas derivados de la insuficiencia hepatocelular y de la hipertensión portal (HTP) como la ictericia, la hemorragia digestiva de origen variceal, la ascitis o la encefalopatía hepática (EH). Otras complicaciones son la peritonitis bacteriana espontánea (PBE), el síndrome hepatorenal (SHR), ambos asociados a la ascitis, o el desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC) (19).

En cuanto a los datos analíticos, se suele observar una elevación leve o moderada de la aspartato aminotransferasa (AST) mayor que de la alanina aminotransferasa (ALT); sin embargo, niveles normales no excluyen la cirrosis hepática (20). En la mayoría de las hepatopatías crónicas, con excepción de la hepatitis alcohólica, el cociente AST/ALT es menor de 1; con inversión del mismo a medida que la hepatopatía progresa a la fase de cirrosis. La fosfatasa alcalina (FA) y la GGT están elevadas en las hepatopatías colestásicas. El tiempo de protrombina (TP) y el ratio internacional normalizado (INR) están elevados debido al déficit de factores de coagulación. Los niveles de bilirrubina aumentan, mientras que los niveles de albúmina bajan a medida que disminuye la capacidad funcional hepática. Es frecuente encontrar anemia normocrómica; sin embargo, la presencia de anemia macrocítica es más típica en la hepatopatía alcohólica.

La leucopenia y la trombocitopenia también son frecuentes debidos al secuestro esplénico y a la supresión medular secundaria al alcohol (21). Las inmunoglobulinas (Ig), especialmente la fracción gamma, están elevadas debido a la alteración en el aclaramiento hepático (22). La tabla 1 muestra los rangos fisiológicos de los parámetros analíticos.

**Tabla 1.** Rangos fisiológicos de los parámetros analíticos.

PARÁMETRO	RANGO FISIOLÓGICO
AST	1-37 U/L
ALT	1-41 U/L
GGT	1-55 U/L
FA	30-120 U/L
Bilirrubina	0,10-1,00 mg/dL
Albúmina	3,4-5,4 g/dL
TP	11-13,5 segundos
INR	0,9-1,3
Leucocitos	4,5-11 x10 <sup>9</sup> /L
Hemoglobina	Hombres: 13,8-17,2 g/dL Mujeres: 12,1-15,1 g/dL
Plaquetas	150-400 x10 <sup>9</sup> /L

**Abreviaturas:** AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transferasa; FA: fosfatasa alcalina; TP: tiempo de protrombina; INR: ratio internacional normalizado.

En la práctica clínica se utilizan 2 escalas pronósticas de función hepática (Tabla 2):

1. **Child-Pugh:** evalúa la supervivencia en ausencia de trasplante. Se calcula de acuerdo con el grado de ascitis, las concentraciones plasmáticas de bilirrubina, albúmina, INR, y el grado de EH. Una puntuación total de 5-6 es considerada grado A (enfermedad compensada; supervivencia a los 2 años del 85%); 7-9 es grado B (compromiso funcional significativo; supervivencia a los 2 años del 57%); y 10-15 es grado C (enfermedad descompensada; supervivencia a los 2 años del 35%). Es un buen predictor de gravedad de hepatopatía en fase de cirrosis, utilizado por su fácil manejo pero con la limitación de utilizar variables subjetivas como la ascitis o la EH y de no distinguir de manera continua la severidad de la enfermedad, manteniendo 3 categorías inamovibles (23).

2. **Model for end stage liver disease (MELD):** valora la gravedad de la cirrosis hepática y se utiliza para priorizar los pacientes en lista de trasplante. Aplica 3 variables sencillas y objetivas, dos de ellas (bilirrubina e INR) relacionadas con el grado de insuficiencia hepática, y la tercera (creatinina) relacionada con la disfunción renal, una complicación frecuente en los estadios avanzados de la cirrosis. La probabilidad de mortalidad a los 3 meses aumenta conforme aumenta la puntuación MELD (24).

**Tabla 2.** Escalas Child-Pugh y MELD.

Escala Child-Pugh			
MEDICIÓN	1 punto	2 puntos	3 puntos
<b>Bilirrubina</b>	<2 mg/dL	2-3 mg/dL	>3 mg/dL
<b>Albúmina</b>	>3,5 g/dL	2,8-3,5 g/dL	<2,8 g/dL
<b>INR</b>	<1,7	1,7-2,3	>2,3
<b>Ascitis</b>	Ausente	Leve	Moderada-grave (refractaria)
<b>Encefalopatía hepática</b>	Ausente	Grado I-II	Grado III-IV

Índice MELD
$9.6 \times \ln [\text{creatinina (mg/dL)}] + 3.8 \times \ln [\text{bilirrubina (mg/dL)}] + 11.2 \times \ln (\text{INR}) + 6.43$

**Abreviaturas:** INR: ratio internacional normalizado.

Varias pruebas de imagen se utilizan junto con las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la cirrosis hepática. Estas incluyen la ecografía hepática, la tomografía computarizada (TC), la resonancia magnética (RM) y la elastografía de transición (fibroscan).

La ecografía es una prueba de bajo coste económico, no invasiva y ampliamente disponible. Puede detectar la irregularidad y nodularidad hepática, así como determinar el ratio entre el diámetro del lóbulo caudado y el lóbulo derecho, generalmente aumentado en la cirrosis hepática (25). Además, es una exploración útil para la detección precoz del CHC y la función Doppler permite valorar la permeabilidad de las venas suprahepática, la porta, mesentérica y esplénica.

La TC y la RM con contraste pueden ser utilizadas para el diagnóstico del CHC y de lesiones vasculares, con una mayor rentabilidad de la RM (26). La RM también puede usarse para valorar los depósitos de hierro y grasa en el caso de la hemocromatosis y la esteatosis, así como la obstrucción de la vía biliar con la utilización de la colangiografía RM (27-28). Sin embargo, es cara y no está siempre disponible.

El fibroscan se utiliza para evaluar la fibrosis y la esteatosis hepática, de forma rápida y con una buena correlación con la biopsia (29-30). Resulta muy útil para estudiar la evolución de la enfermedad pero se ve limitada en algunas situaciones como la edad avanzada, la obesidad, los estadios terminales de la cirrosis y es operador-dependiente (31).

## **1.5. Patogenia**

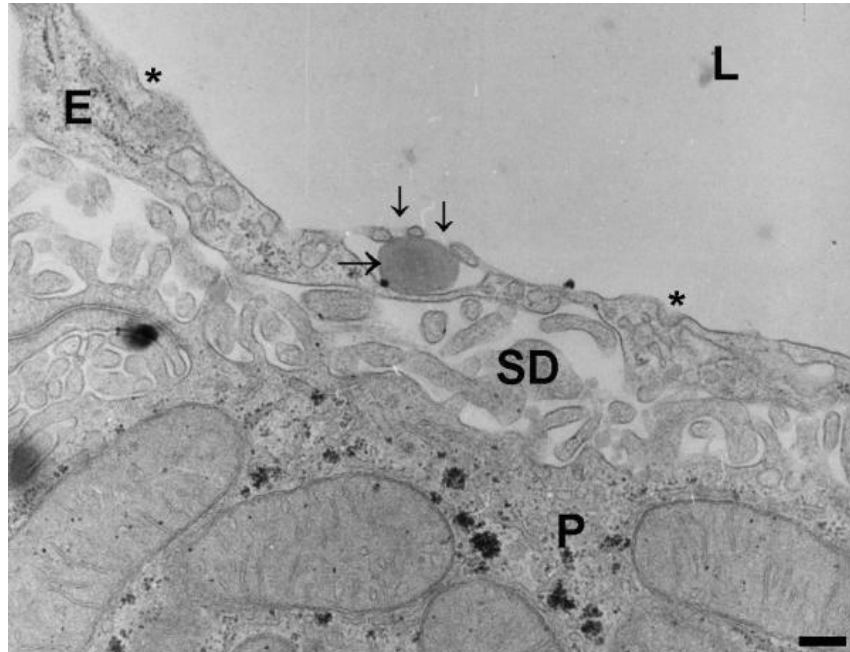
Múltiples células intervienen en la patogénesis de la cirrosis hepática incluyendo los hepatocitos y las células del sinusoides como las células estrelladas, las células endoteliales y las células de Kupffer.

Los hepatocitos lesionados liberan especies reactivas de oxígeno y mediadores inflamatorios que provocan la activación de las células estrelladas y la fibrosis hepática (32).

Las células estrelladas forman parte de la pared del sinusoides hepático y su función es almacenar vitamina A. Cuando éstas se exponen a citocinas inflamatorias, se activan, se transforman en miofibroblastos y depositan colágeno con el subsiguiente desarrollo de fibrosis (33).

Las células endoteliales forman el revestimiento sinusoidal y se caracterizan por dejar fenestraciones en la pared que permiten el intercambio de fluidos y nutrientes entre el sinusoides y los hepatocitos (33-34) (Figura 3). El consumo crónico de alcohol puede incurrir en la defenestración de la pared del sinusoides y la aparición de fibrosis perisinusoidal (35).

Las células de Kupffer son macrófagos satélites encargados de liberar mediadores ante la exposición a agentes nocivos y actuar como células presentadoras de antígeno (CPA) para virus (36).



**Figura 3.** Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución de un sinusoide hepático. La luz del sinusoide (L) está revestida por el endotelio (E) dando lugar a fenestras (flechas pequeñas) y áreas recubiertas (asterisco). Se observa una partícula lipídica (flecha grande) pasando a través de las fenestras. El espacio de Disse (SD) se localiza entre el endotelio y los hepatocitos y contiene numerosas microvellosidades de las células parenquimatosas (P) (34).

La aparición de fibrosis da lugar a la formación de nuevos vasos dentro de la vaina que rodea a los nódulos de regeneración, cuya capacidad para drenar el volumen sanguíneo está reducida. Además, se producen cambios en la regulación vasomotora, tanto intrahepáticamente como de forma sistémica (37).

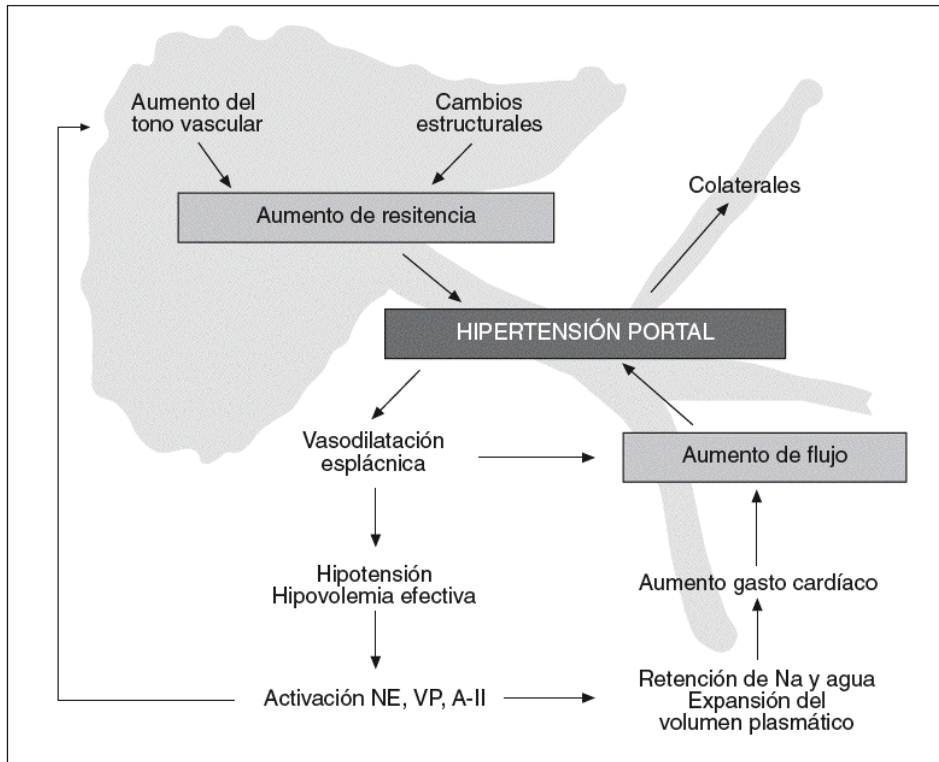
Intrahepáticamente, las células endoteliales sintetizan óxido nítrico y endotelina-1, que actúan sobre las células estrelladas provocando relajación o contracción del sinusoide respectivamente. En pacientes con cirrosis hepática, se observa un aumento en la producción de endotelina-1 y en la sensibilidad de sus receptores con descenso en la producción de óxido nítrico. Esto condiciona una mayor vasoconstricción y remodelación

vascular por la contracción de las células estrelladas en los sinusoides que da lugar a un aumento en la resistencia vascular (38).

En la circulación sistémica y esplácnica se produce el efecto contrario. El incremento en la producción de óxido nítrico da lugar a una vasodilatación con la consiguiente disminución de la resistencia vascular periférica. Esto promueve la activación de los sistemas renina-angiotensina-aldosterona, la reabsorción de sodio y retención de agua y la aparición de circulación hiperdinámica (39).

La formación de colaterales portosistémicas tiene la finalidad de derivar una proporción significativa del flujo esplácnico hasta la circulación general sin pasar por el hígado. Ello comporta consecuencias relevantes como la formación de varices esofágicas, evento clave en la historia natural de la cirrosis (8). La derivación portosistémica permite que bacterias y productos bacterianos de procedencia intestinal alcancen la circulación general, favoreciendo a su vez la liberación de citocinas que promueven la síntesis de sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico o la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Además, a través de la derivación circulan péptidos gastrointestinales vasoactivos como el glucagón que escapan al catabolismo hepático ejerciendo efecto vasodilatador sistémico. Estos fenómenos contribuyen a explicar la circulación hiperdinámica observada en la cirrosis hepática, manifestada por un descenso de la presión arterial, aumento del gasto cardíaco y elevación del aflujo de sangre al territorio portal, el cual contribuye a elevar y mantener la HTP en fases avanzadas (Figura 4) (40).

En condiciones normales, el hígado desempeña un papel clave en la detoxificación de sustancias potencialmente dañinas, incluyendo toxinas producidas por los desechos naturales del organismo como el amonio (40). La insuficiencia hepatocelular junto con la HTP conducen a una alteración en estas funciones básicas dando lugar a un estado de hiperamonemia e inflamación que, a su vez, contribuyen al desarrollo de EH.



**Figura 4.** Resumen de la fisiopatología de la hipertensión portal.  
**Abreviaturas:** NE: norepinefrina; VP: vasopresina; A-II: angiotensina-II.



## **2. ENCEFALOPATIA HEPATICA**

### **2.1. Definición**

La EH es un síndrome neuropsiquiátrico complejo, producto de la insuficiencia hepática y/o la existencia de derivaciones portosistémicas, que se manifiesta a través de un amplio espectro de anormalidades neurológicas o psiquiátricas constituyendo una entidad subclínica o comprometiendo el estado de conciencia (41-42).

Cuando estas alteraciones no son clínicamente evidentes, según la Sociedad Internacional para la EH y el Metabolismo del Nitrógeno (ISHEN), se denomina EH encubierta (EHE). Este término incluye la EH mínima (EHM) y la EH grado I (43-44). La EHM se define como la presencia de disfunción neurológica, en ausencia de signos clínicos o cognitivos evidentes pero detectada por anormalidades en pruebas psicométricas o neurofisiológicas. Asimismo, la EH clínica (EHC) se define como la aparición síntomas o signos como la desorientación o asterixis (43-44).

### **2.2. Epidemiología**

La incidencia y prevalencia de la EH están relacionadas con la gravedad de la insuficiencia hepática subyacente y la derivación portosistémica.

La prevalencia de la EHC en el momento del diagnóstico de la cirrosis es del 10-14% de forma general (45-46), del 16-21% en pacientes con cirrosis descompensada (47) y del 20-50% en pacientes con derivación portosistémica intrahepática transyugular (TIPS - *transjugular intrahepatic portosystemic shunt*-) (48-49).

El 30-50% de los pacientes con cirrosis desarrolla algún episodio de EHC y en la mayoría de los casos de forma repetida. La EHM representa la etapa preclínica y ocurre hasta en el 80% de los pacientes con cirrosis, dependiendo de la elección de las pruebas diagnósticas (50-53).

El riesgo acumulado de un primer episodio de EHC es del 5-25% a los 5 años del diagnóstico de la cirrosis, dependiendo de factores de riesgo como otras complicaciones de la cirrosis (EHM, infecciones incluyendo PBE, infección del tracto urinario, respiratoria o cutánea, hemorragia digestiva, ascitis o hiponatremia), la diabetes mellitus tipo 2, la utilización de beta-bloqueantes no cardioselectivos (BBNC) o inhibidores de la bomba de protones (IBP) (54-59).

La EH es la principal causa de ingreso hospitalario en pacientes con cirrosis descompensada, lo cual representa más de 100.000 ingresos anuales con un gasto de 7.000 millones de dólares (60). Además, existe una carga familiar significativa dada la gran necesidad de apoyo con unas tasas de depresión y ansiedad de un 20% entre los cuidadores (61).

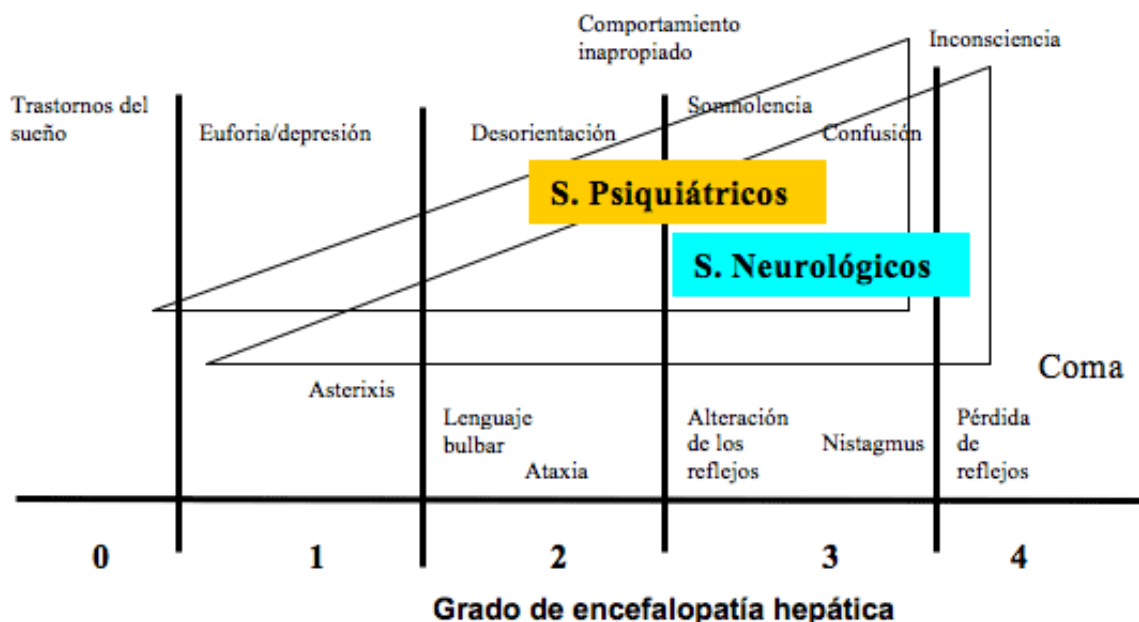
La EH se caracteriza por ser potencialmente reversible. Sin embargo, su aparición conlleva un mal pronóstico. Se estima que la mortalidad es del 40% y 70% al año y tres años tras un primer episodio de EHC (62-63). Esta alta mortalidad no solo se limita a la aparición de EHC sino que pacientes con EHM también presentan menores tasas de supervivencia (64-66).

### **2.3. Manifestaciones clínicas**

La EH produce una amplia variedad de signos y síntomas neurológicos y psiquiátricos.

La EHM es la forma más leve dentro del espectro de la EH y se caracteriza por alteraciones cognitivas sutiles que afectan principalmente a la capacidad de atención, la velocidad del procesamiento de la información, el control ejecutivo, la capacidad motora y la coordinación, en ausencia de síntomas reconocibles clínicamente (67-68). La EHM condiciona la calidad de vida de los pacientes (69-70), aumenta el riesgo de padecer accidentes laborales, domésticos y de tráfico, predispone a sufrir EHC y aumenta la mortalidad (71-72).

Pacientes con EHC presentan signos y síntomas que pueden ser detectados clínicamente. En estadios iniciales se manifiesta con cambios de personalidad como apatía, irritabilidad o desinhibición y alteraciones en el ciclo vigilia-sueño (73-74). A medida que la enfermedad progresa, aparecen cambios de humor (euforia o depresión) con comportamiento inadecuado, desorientación en espacio y tiempo, agitación o somnolencia, confusión y, finalmente, coma (75). Entre las alteraciones neuromusculares, la asterixis define el paso de una etapa temprana a otra intermedia en la EH. Se describe como un temblor de aleteo; sin embargo, no es un verdadero temblor, sino una mioclonía resultado de la pérdida del tono postural causada por una alteración en la función de los centros motores diencefálicos que regulan el tono de los músculos agonistas y antagonistas (76). Otras alteraciones neuromusculares incluyen hipertonia, hiperreflexia con reflejos tendinosos profundos hipoactivos, bradicinesia, hipomimia y bradilalia (77-78). Sin embargo, las alteraciones cognitivas y comportamentales pueden no progresar en paralelo con las alteraciones motoras, dificultando determinar la gravedad de la EH (Figura 5). Dadas las múltiples presentaciones, se han desarrollado criterios de clasificación para evaluar mejor los síntomas y el estado general de forma individual.



**Figura 5.** Diagrama de las manifestaciones clínicas asociadas a los distintos estadios de la encefalopatía hepática.

### 2.3.1. Clasificación

La EH se clasifica en base a 4 factores (41):

1. Enfermedad subyacente:
  - a. Tipo A: resultado de un fallo hepático agudo.
  - b. Tipo B: resultado de una derivación portosistémica.
  - c. Tipo C: resultado de una cirrosis hepática.
  
2. Gravedad de las manifestaciones (Tabla 3).

**Tabla 3.** Gravedad de las manifestaciones clínicas según la clasificación de West Haven y de la ISHEN (43-44).

Crterios West Haven	ISHEN	Manifestaciones clínicas
<b>Grado 0</b>		Sin alteraciones
<b>Mínima</b>	Encubierta	Alteración en test psicométricos o neurofisiológicos sin evidencia clínica
<b>Grado I</b>		Alteración mínima en la conciencia Euforia o ansiedad Atención disminuida Deterioro en la capacidad sumatoria Alteración del ciclo del sueño
<b>Grado II</b>	Clínica	Letargia Desorientación en tiempo Cambios en la personalidad Comportamiento inapropiado Dificultad para hablar Asterixis
<b>Grado III</b>		Somnolencia o semi-estupor Respuesta a estímulos Confusión Desorientación grave Comportamiento extraño
<b>Grado IV</b>		Coma

**Abreviaturas:** ISHEN: Sociedad Internacional para la EH y el Metabolismo del Nitrógeno

3. Curso evolutivo:
  - a. Episódico: episodios separados >6 meses.
  - b. Recurrente: episodios en un intervalo de  $\leq 6$  meses.
  - c. Persistente: patrón de alteraciones comportamentales presentes de forma permanente con episodios de EH más manifiesta.

4. Presencia de factores precipitantes:
  - a. No presentes o espontáneo.
  - b. Presentes: deben ser identificados y tratados (Tabla 4).

**Tabla 4.** Factores precipitantes de encefalopatía hepática por orden decreciente de frecuencia.

Episódica	Recurrente
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infecciones</li> <li>- Hemorragia gastrointestinal</li> <li>- Sobredosis de diuréticos</li> <li>- Alteración hidroelectrolítica</li> <li>- Estreñimiento</li> <li>- No identificado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alteración hidroelectrolítica</li> <li>- Infecciones</li> <li>- No identificado</li> <li>- Estreñimiento</li> <li>- Sobredosis de diuréticos</li> <li>- Hemorragia gastrointestinal</li> </ul>

## 2.4. Diagnóstico

Las estrategias para el diagnóstico de la EH van desde simples escalas clínicas hasta sofisticadas herramientas psicométricas y neurofisiológicas. Sin embargo, ninguna de las pruebas actuales es válida para todo el espectro clínico y difieren según la forma de presentación y el grado de deterioro.

### 2.4.1. Encefalopatía hepática clínica

El diagnóstico de la EHC se basa en una historia clínica y exploración física detalladas para detectar las alteraciones cognitivas y neuromusculares características. Los criterios de West Haven (41), entre otras escalas como la *Hepatic Encephalopathy Scoring Algorithm* (79) o la *Clinical Hepatic Encephalopathy Staging Scale* (80), se utilizan para valorar la gravedad. Sin embargo, estas escalas son subjetivas con una fiabilidad interobservador limitada, especialmente en los casos leves. En pacientes con grados avanzados (grados III y IV) de EH, la escala de coma de Glasgow (Tabla 5) (81) es ampliamente utilizada. No obstante, el diagnóstico de EHC es un diagnóstico de exclusión y, por tanto, habrá que considerar otras causas de daño cerebral (alteraciones en la glucemia, intoxicación etílica o síndrome de abstinencia, fármacos, neuroinfecciones,

alteraciones hidroelectrolíticas, epilepsia, alteraciones psiquiátricas, ictus o hemorragia cerebral, etc.) que deberán ser excluidas mediante pruebas de laboratorio y de imagen cuando exista sospecha clínica.

**Tabla 5.** Escala de coma de Glasgow (81).

PARÁMETROS	RESPUESTA OBSERVADA	PUNTUACIÓN
<b>Abertura ocular</b>	- Espontánea	4
	- Al estímulo verbal	3
	- Al estímulo doloroso	2
	- Ninguna	1
<b>Respuesta verbal</b>	- Orientada	5
	- Confusa	4
	- Palabras inadecuadas	3
	- Sonidos incomprensibles	2
	- Ninguna	1
<b>Respuesta motora</b>	- Obedece órdenes	6
	- Localiza el dolor	5
	- Movimiento de retirada	4
	- Flexión hipertónica (decorticación)	3
	- Extensión hipertónica (descerebración)	2
	- Ninguna	1
<b>Trauma leve</b>	<b>Trauma moderado</b>	<b>Trauma grave</b>
13-15	9-12	3-8

Actualmente no existe una prueba de laboratorio que pueda ser utilizada como test de referencia para el diagnóstico de la EH. Por si solos, los niveles elevados de amonio en sangre no tienen valor diagnóstico ni pronóstico en pacientes con EH (82). Son inespecíficos y pueden verse influidos por factores como la forma de obtención y procesamiento de la muestra. Además, pueden estar elevados en una amplia variedad de enfermedades no hepáticas (Tabla 6) (83). Así pues, para el diagnóstico de la EH no es necesaria su determinación y tampoco está indicada en pacientes asintomáticos o con alteraciones cognitivas en ausencia de enfermedad hepática o derivación portosistémica (84). Sin embargo, en caso de que al determinar los niveles de amonio en pacientes con alteraciones neurocognitivas estos fueran normales, habría que poner en duda el diagnóstico de EH (41).

Además de las pruebas de laboratorio, pacientes con un nivel de conciencia alterado frecuentemente recibirán una prueba de imagen cerebral, generalmente una TC. Aunque esta suele ser normal, pueden haber hallazgos sutiles que sugieran atrofia cortical frontal o edema cerebral (85). No obstante, a menos que haya algún déficit neurológico focal en la exploración física, la realización de una prueba de imagen no será necesaria (86).

**Tabla 6.** Diagnóstico diferencial de la hiperamonemia.

Síndrome de Reye	Hemorragia gastrointestinal
Enfermedad renal	Infección del tracto urinario
Ureterosigmoidostomía	Shock
Esfuerzo muscular intenso	Tabaquismo
Derivación portosistémica	Nutrición parenteral
Intoxicación por salicilatos	Altas dosis de quimioterapia
Fármacos: ácido valproico, barbitúricos, narcóticos, diuréticos, alcohol	Alteraciones del metabolismo del recién nacido (defectos del ciclo de la urea)

#### 2.4.2. Encefalopatía hepática mínima

El correcto diagnóstico de la EHM se ha vuelto una prioridad dada su asociación con un peor pronóstico de la enfermedad hepática. El diagnóstico se basa en la realización de test diagnósticos y, aunque actualmente no existe un estándar de oro, algunas de las pruebas permiten pronosticar el riesgo de progresión a EHC. Estos test se dividen en 2 grandes grupos: test psicométricos y neurofisiológicos (87-88).

Los test psicométricos a pesar de caracterizarse por una alta sensibilidad y un bajo coste, no se suelen utilizar en la práctica clínica dado que requieren tiempo y su rentabilidad se ve disminuida por un efecto de aprendizaje cuando se realizan repetidamente. Además, existe una mala correlación entre las distintas pruebas, no son específicas y son particularmente difíciles de aplicar en algunas entidades como la enfermedad hepática alcohólica o en la enfermedad de Wilson (89-90). El *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score* (PHES) consta de una batería de 5 subtest que evalúan la velocidad del procesamiento mental y la coordinación. Fue desarrollado y estandarizado en Alemania. Posteriormente, el Grupo de Consenso de EH en el Congreso Mundial de Gastroenterología en 1998 lo reconoció como el test de referencia para el diagnóstico de la EHM. A partir de ese momento, ha sido ampliamente utilizado gracias a su fácil

realización con lápiz y papel sin necesidad de capacitación profesional o equipo avanzado (91).

El electroencefalograma (EEG) es una prueba electrofisiológica que monitoriza la actividad cerebral y es capaz de detectar anomalías provocadas por componentes tóxicos o metabólicos (92). Este puede ser utilizado junto con el PHES para el diagnóstico de la EHM (41). Además, a diferencia del PHES, los resultados del EEG no se ven afectados por la edad, el nivel de inteligencia o educación y no requiere cooperación (92).

Dado que diferentes componentes cognitivos pueden verse afectados en distinto grado, la ISHEN recomienda la realización de al menos 2 test diferentes dependiendo de la disponibilidad en cada centro (87-88).

## **2.5. Patogenia**

La patogénesis de la EH no está claramente definida y se considera multifactorial. Aunque la neurotoxicidad secundaria a la hiperamonemia sigue siendo fundamental para el desarrollo de la EH, en la última década se han identificado múltiples mecanismos patogénicos nuevos (93). Así pues, parece probable que neurotoxinas provenientes del tracto gastrointestinal, junto con alteraciones en la microbiota intestinal y en la transmisión neuronal, actúan de forma sinérgica con la respuesta inflamatoria sistémica, dando lugar a la EH.

### **2.5.1. Hiperamonemia**

La principal entrada de amonio en el organismo es a través del tracto gastrointestinal, fundamentalmente mediante 2 mecanismos: la desaminación de la glutamina a través de la glutaminasa de los enterocitos y el catabolismo bacteriano colónico de sustancias nitrogenadas como las proteínas ingeridas. Esto da lugar a una forma no ionizada de amonio que puede atravesar libremente el epitelio intestinal y entrar en la circulación portal. La ionización del amonio depende del pH de la luz del colon, de modo que un pH más ácido conduce a la protonización y atrapamiento del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en la luz. Los



disacáridos no absorbibles como la lactulosa, disminuyen el pH del colon además de tener un efecto laxante y conducen a una disminución en la absorción de amonio (94).

En condiciones normales, la mayor parte (90%) del amonio es detoxificado en el hígado mediante el ciclo de la urea y eliminado con la orina. En tejidos como el cerebro, el músculo o el riñón, 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 (94).

En la cirrosis hepática, el amonio no es eliminado eficientemente como consecuencia de la insuficiencia hepatocelular y de la creación de derivaciones portosistémicas y aumenta sus niveles en sangre (95). La sarcopenia, frecuentemente presente en estos pacientes, puede contribuir ya que el músculo juega un papel importante en la eliminación del amonio extrahepático (96). Además, se ha visto que pacientes con cirrosis hepática presentan una proporción reducida de aminoácidos de cadena ramificada posiblemente debido a un aumento del metabolismo dentro del músculo esquelético (97). Dado el papel de los aminoácidos ramificados para generar glutamato, su déficit conduce a una capacidad reducida de los músculos para detoxificar el amonio mediante la unión de glutamina. Así pues, la suplementación dietética con aminoácidos de cadena ramificada puede ser beneficiosa en el tratamiento de la EH en pacientes que no responden al tratamiento convencional (98). El zinc es un cofactor en el ciclo de la urea fundamental para la detoxificación del amonio. El déficit de zinc en pacientes con cirrosis hepática es muy alto, de modo que la suplementación también puede mejorar la EH (99-100).

El aumento de amonio en plasma provoca múltiples alteraciones cerebrales. Después de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), el amonio se metaboliza a glutamina en los astrocitos. Debido al aumento en la osmolaridad intracelular astrocitaria resultado del metabolismo del amonio para la formación de glutamina, se produce edema cerebral (101-102). Otro factor que contribuye al edema de los astrocitos es la hiponatremia dado que se asocia con una reducción de osmolitos orgánicos en el cerebro, haciéndolo más susceptible al daño. La hiponatremia es frecuente en pacientes con cirrosis por lo que su corrección será importante para la prevención y tratamiento de la EH (103).

Otros mecanismos de lesión neuronal por el amonio incluyen la lesión mitocondrial, el estrés oxidativo, la disfunción celular, la afectación de las sinapsis dependientes de glutamato y los efectos del ácido gamma-aminobutírico (GABA). Paralelamente, la hiperamonemia produce alteraciones en el transporte de aminoácidos a través de la BHE, dando lugar a un aumento en la concentración cerebral de aminoácidos neutros que pueden afectar la síntesis de los neurotransmisores dopamina, noradrenalina y serotonina (104).

### **2.5.2. Eje intestino-hígado-cerebro: Microbiota intestinal**

Se ha demostrado que cambios en la microbiota intestinal desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la EH. La producción disminuida de ácidos biliares en la cirrosis avanzada da como resultado un aumento en la proliferación de patógenos productores de ureasa como los *Enterobacteriaceae* con una reducción asociada de la flora comensal (105). Además, se ha visto que pacientes con EH presentan con mayor frecuencia disbiosis intestinal, hiperamonemia e inflamación sistémica comparado con pacientes con cirrosis sin EH y con controles (106). Basado en esta teoría, se han probado fármacos modificadores de la flora intestinal. Los probióticos, han demostrado reducir los niveles séricos de amonio y endotoxinas y mejorar la EHM (107). El primer ensayo clínico randomizado para el trasplante de microbiota fecal en pacientes con cirrosis y EH recurrente ha demostrado que los pacientes tratados presentan menos hospitalizaciones y episodios de EH que el brazo de tratamiento estándar (108).

### **2.5.3. Alteraciones en la neurotransmisión**

La EH se caracteriza por alteraciones bioquímicas que afectan a las funciones de las membranas neuronales, tales como la recepción de neurotransmisores, actividades enzimáticas y la expresión de receptores (109).

Se han estudiado varios sistemas de neurotransmisión en modelos experimentales a través de métodos neuroquímicos, neuroconductuales y electrofisiológicos y se han descrito cambios en los sistemas de neurotransmisión GABAérgico, dopaminérgico, serotoninérgico y glutamatérgico (110-111).

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del cerebro. Una de las teorías propuestas para el desarrollo de la EH es el aumento del tono de este sistema neurotransmisor a través de sustancias similares a las benzodiazepinas de origen endógeno como los neuroesteroides (112). Además, se ha demostrado una mayor concentración de receptores de benzodiazepinas en la membrana mitocondrial de los astrocitos en respuesta a la exposición al amonio (113). En base a estas observaciones, se han realizado estudios con la administración de antagonistas del receptor de las benzodiazepinas como el flumacénilo con mejoría transitoria clínica y en el EEG (114).

Algunos de los síntomas extrapiramidales pueden deberse a una función dopaminérgica alterada, estrechamente relacionada con la acumulación de manganeso en los ganglios basales (115). Esta acumulación de manganeso parece debida a un intento del cerebro de corregir la deficiencia de dopamina en la cirrosis hepática (116). Se ha visto que el tratamiento con L-Dopa puede mejorar estos síntomas y que el trasplante hepático puede resolverlos (115).

También se ha observado que metabolitos derivados de la serotonina como el ácido 5-hidroxiindolacético están elevados en cerebros de pacientes fallecidos por coma hepático (117). Esto conduce a una reducción en los depósitos de serotonina y a una menor disponibilidad para su liberación en la terminal presináptica con la consiguiente aparición de síntomas neuropsiquiátricos como la depresión o la alteración del patrón del sueño (118).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del cerebro cuya transmisión se ve reducida en la EH debido a alteraciones en la expresión y actividad de sus transportadores en la hendidura sináptica (119) y a una liberación reducida en la terminación nerviosa secundaria a una síntesis reducida (120), lo cual contribuye a la aparición de los síntomas típicos de la EH.

#### **2.5.4. Respuesta inflamatoria sistémica**

En la cirrosis hepática se observa un estado de inflamación crónica debido a la propagación sistémica de bacterias y productos bacterianos, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs *-pathogen-associated molecular patterns-*),

resultado de cambios en la microbiota y el aumento de la permeabilidad intestinal (121-122). Otras moléculas, conocidas como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs *-damage-associated molecular patterns-*) y que son liberadas por el hígado dañado debido a la inflamación local asociada a la apoptosis y necrosis celular, juegan un papel similar. Ambas, PAMPs y DAMPs, se unen a los receptores de las células encargadas de la inmunidad innata que, una vez activadas, producen y liberan moléculas proinflamatorias junto con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Esta cascada inflamatoria contribuye a la disfunción circulatoria y favorece el desarrollo de las complicaciones asociadas a la cirrosis, entre ellas la EH (123-124).

Diferentes desencadenantes pueden exacerbar este estado inflamatorio típico de la cirrosis hepática. La infección y el daño hepatocelular directo son los más frecuentes y dan lugar a la liberación de citocinas proinflamatorias y mediadores encargados de exacerbar los síntomas de la EH (125). A su vez, la gravedad de la EH se asocia con niveles crecientes de TNF $\alpha$ , interleucina(IL)-6 e IL-18 y no se desarrolla en ausencia de respuesta inflamatoria sistémica a pesar de niveles elevados de amonio (126-128). Esto sugiere un rol esencial de la inflamación en la patogenia de la EH.

## **2.6. Tratamiento**

Las terapias disponibles en la actualidad para la EH se basan en las hipótesis de su fisiopatología (Tabla 7).

### **2.6.1. Encefalopatía hepática clínica**

Un episodio de EHC debe ser tratado activamente y se administrará profilaxis secundaria tras la resolución del mismo. No se recomienda profilaxis primaria excepto en pacientes con factores de alto riesgo de EH. La EHC recurrente, junto con el deterioro de la función hepática, es una indicación de trasplante (41).

Para el manejo de la EHC se recomienda un enfoque con 4 puntos clave:

1. Atención intensiva en pacientes con alteración del nivel de conciencia.
2. Búsqueda y exclusión de causas alternativas de alteración del nivel de conciencia.
3. Identificación de los factores precipitantes y su corrección.
4. Inicio de terapia empírica para la EH.

**Tabla 7.** Efectividad de los tratamientos para la encefalopatía hepática.

Mecanismo	Estudios controlados	
	vs lactulosa	vs placebo
Reducción de los sustratos de amonio: - Enemas de lactulosa - Restricción de proteínas de la dieta		+
Inhibición de la producción de amonio: - Antibióticos: ○ Rifaximina ○ Neomicina ○ Metronidazol - Disacáridos no absorbibles ○ Lactulosa ○ Lactitol ○ Lactosa en intolerancia - Probióticos: Lactubacillus SF 68	= = =  =  = =	+ ND ND  ND + ND
Eliminación de amonio: - L-ornitina L-aspartato		+
Suplementación de aminoácidos ramificados: - Soluciones de aminoácidos modificados (FO80) - Suplementos en la dieta	=	± +
Aumento de dopamina: DOPA, bromocriptina		-
Hipótesis GABA: Flumazenilo		+
Otros: Zinc		±

+ superior al control; = igual que la lactulosa; - sin efecto; ± resultados contradictorios; ND no realizado.

Debe mantenerse un adecuado balance nutricional, evitando la deshidratación y las alteraciones electrolíticas. Los pacientes con cirrosis hepática frecuentemente presentan malnutrición y la restricción proteica de la dieta se asocia a una mayor mortalidad, por lo que no está recomendada en la mayoría de los casos (129). En pacientes cuyos síntomas empeoran con las proteínas de origen animal o lácteo, estas pueden sustituirse por proteínas vegetales que mejoran el balance nitrogenado (130). Otra alternativa es la suplementación de una dieta baja en proteínas con aminoácidos de cadena ramificada

(98). Al mismo tiempo, la corrección de la hipokalemia, si está presente, es esencial en el tratamiento de la EH, ya que aumenta la producción renal de amonio (131).

Los fármacos más utilizados para la reducción de los niveles de amonio son los disacáridos no absorbibles como la lactulosa y el lactitol y los antibióticos como la rifaximina.

#### *Disacáridos no absorbibles*

La lactulosa se utiliza generalmente como tratamiento inicial para la EHC (132). Tanto la lactulosa como el lactitol alcanzan el colon donde son catabolizados por las bacterias a ácidos grasos de cadena corta reduciendo el pH intestinal e induciendo la formación de amonio no absorbible. La dosis de lactulosa (20-30g de 2 a 4 veces al día) debe ajustarse para lograr dos o tres deposiciones blandas al día. Una dosis equivalente de lactitol es de aproximadamente 67-100g diluidos en 100ml de agua. Se pueden administrar enemas de lactulosa o lactitol si el paciente no puede tomarlos por vía oral (133). En pacientes con deficiencia de lactasa, la lactosa tiene prácticamente el mismo efecto y es más económica.

La lactulosa se ha utilizado tradicionalmente para el mantenimiento de la remisión con una eficacia de aproximadamente el 70-80% (134). Generalmente es bien tolerada aunque presenta un sabor desagradable y puede producir diarrea, náuseas o hinchazón, que pueden conducir a una falta de adherencia (135).

En un ensayo clínico para la prevención de la recurrencia, los pacientes con lactulosa presentaron menos episodios de EHC que los pacientes con placebo sin diferencias en las tasas de hospitalización por otras causas distintas a la EH ni en mortalidad (136).

#### *Rifaximina*

La rifaximina es un antibiótico oral de amplio espectro comúnmente utilizado para el tratamiento de la EH. Actúa inhibiendo la síntesis bacteriana al unirse a la ácido ribonucleico (ARN) polimerasa bacteriana dependiente de ácido desoxirribonucleico (ADN). Tiene una absorción sistémica limitada por lo que su elevada concentración en el tracto gastrointestinal modula la composición y función de las bacterias y los ácidos biliares reduciendo el nivel de amonio, la formación de toxinas y de mediadores de

inflamación (137). Es eliminada principalmente a través de las heces y tiene una tasa muy baja de efectos secundarios (138). Fue aprobada en el 2010 en Estados Unidos y la dosis recomendada es de 400mg 3 veces al día vía oral.

Las guías clínicas actuales recomiendan lactulosa como tratamiento de primera línea para la EHC (41); sin embargo, la rifaximina en monoterapia ha demostrado su eficacia y la no inferioridad a la lactulosa por lo que también podría administrarse (139). De hecho, para pacientes con EH grave se recomienda la terapia combinada de lactulosa con rifaximina dado que parece más eficaz que cualquiera de los dos tratamientos en monoterapia. Además, la terapia combinada se asocia con una disminución en la estancia hospitalaria y en la mortalidad (140).

También ha sido comparada con otros antibióticos como la neomicina en pacientes con EH grado 1-3, demostrando mejoría de los síntomas con una mayor reducción en los niveles de amonio y una menor tasa de efectos adversos (141).

En cuanto a la profilaxis secundaria, en un ensayo randomizado y controlado con placebo sobre una cohorte de pacientes con cirrosis descompensada y episodios anteriores de EHC, la rifaximina mantuvo la remisión y redujo el riesgo de hospitalizaciones de manera más efectiva que el placebo, con una toma concomitante de lactulosa de aproximadamente el 90% en ambos brazos (142). De este modo, se recomienda el tratamiento combinado en pacientes con recurrencia de EH durante el tratamiento con lactulosa (143). Estudios adicionales han confirmado el beneficio de la rifaximina en la reducción de la recurrencia de EH, en la mortalidad y en la tasa de hospitalizaciones, con una menor carga económica atribuida a la enfermedad (144-149). Al mismo tiempo, se ha demostrado su seguridad en regímenes de hasta 24 meses (150); no obstante, si el factor precipitante del episodio de EH se resuelve y no hay recurrencias en tres meses, la rifaximina puede suspenderse (145).

#### *Otros antibióticos*

Otros antibióticos como la neomicina, vancomicina o el metronidazol se han utilizado para el tratamiento de la EH. Sin embargo, la rifaximina se ha convertido en el antibiótico más utilizado por su eficacia y seguridad. Aunque la neomicina es un inhibidor de la glutaminasa y disminuye la producción intestinal de amonio, su uso está limitado por

causar ototoxicidad y nefrotoxicidad (151). Del mismo modo, la vancomicina y el metronidazol pueden causar nefrotoxicidad y neurotoxicidad en el caso del metronidazol (152).

#### *Aminoácidos ramificados*

Los aminoácidos de cadena ramificada en formulación oral pueden mejorar las manifestaciones del episodio de EH (98). No obstante, no se ha observado efecto en la mortalidad ni en la calidad de vida (98). Tampoco se ha demostrado beneficio con la administración intravenosa en el episodio agudo (153). Se recomiendan como terapia alternativa o añadida al tratamiento convencional en pacientes no respondedores (41).

#### *L-ornitina L-aspartato*

La L-ornitina L-aspartato actúa reduciendo los niveles de amonio mediante la activación de la carbamoil fosfato sintetasa en el hígado y la glutamina sintetasa en el músculo esquelético, ambas enzimas reducidas en la cirrosis hepática y claves para la síntesis de urea y glutamina respectivamente (154). Un metanálisis de la Cochrane incluyendo 29 ensayos demostró la superioridad de la L-ornitina L-aspartato respecto a placebo en los síntomas de la EH y en la mortalidad; sin embargo, no se encontró ningún beneficio al compararla con otros tratamientos como la lactulosa, la rifaximina o los aminoácidos de cadena ramificada (155). Por ello, se recomienda como terapia alternativa o añadida al tratamiento convencional en pacientes no respondedores (41).

#### *Probióticos*

Los probióticos han demostrado cierto beneficio en el tratamiento de la EH con una eficacia superior al placebo y similar a la lactulosa para la profilaxis secundaria de la EH (156). No obstante, no hay una clara recomendación para su uso en la actualidad (41).

#### *Flumazenilo*

El flumazenilo es un antagonista del receptor de las benzodiazepinas utilizado en la sobredosis de benzodiazepinas. Su administración en el episodio de EH mejora transitoriamente el estado mental pero no la supervivencia (157-158). De este modo, su efecto puede ser útil en situaciones de difícil diagnóstico diferencial o ante sospecha de toxicidad por benzodiazepinas (41).



### *Otros tratamientos*

La administración de agentes dopaminérgicos como la levodopa o bromocriptina en pacientes con EH no ha demostrado mejorar los síntomas ni la mortalidad (159).

La administración de polaprezinc (zinc y L-carnosina) mejoró la EH en un ensayo clínico con 79 pacientes. Sin embargo, no se ha demostrado que la administración de zinc oral disminuya la recurrencia de EH (160-161).

El trasplante de microbiota fecal ha demostrado ser eficaz y seguro en el tratamiento de la EH con su principal limitación en el alto coste. Actualmente podría ser utilizado en el tratamiento de la EHC refractaria al tratamiento médico estándar (162).

### **2.6.2. Encefalopatía hepática mínima**

En el caso de la EHM se recomienda, en primer lugar, implementar terapia nutricional. Esta ha demostrado una buena tasa de remisión de la EHM con un menor desarrollo de episodios de EHC (163). La ingesta diaria recomendada es de 35-40kcal/kg y 1,2-1,5g/kg de proteínas con pequeños suplementos nutricionales distribuidos uniformemente a lo largo del día y a última hora de la noche.

En cuanto al tratamiento farmacológico de la EHM algunos estudios con lactulosa han demostrado mejorar la función cognitiva, prevenir el desarrollo de EHC y mejorar la calidad de vida (164-166). El tratamiento con rifaximina también ha demostrado mejorar las alteraciones cognitivas, la calidad de vida y la capacidad de conducción (167-168) con una buena adherencia y una tasa de efectos secundarios similar al placebo (168). La administración de aminoácidos ramificados puede tener un efecto beneficioso en las manifestaciones de la EHM (98). La L-ornitina L-aspartato oral parece ser superior a la infusión intravenosa en el tratamiento de la EHM (155). Los probióticos también pueden mejorar la EHM y la prevención de la EHC (169). No obstante, la administración de estos fármacos no está recomendada de rutina y la decisión debe ser individualizada en función de las pruebas psicométricas, el grado de afectación de la calidad de vida y las preferencias del paciente (41).

### **3. SISTEMA INMUNITARIO Y RESPUESTA INFLAMATORIA**

#### **3.1. Mecanismos generales**

El sistema inmunitario es el encargado de proteger al organismo frente a agresiones externas y propias del sujeto. Está compuesto por células especializadas y un conjunto de factores que participan en la defensa contra el agente patógeno. Existen dos líneas principales: la respuesta innata y la respuesta adaptativa. Ambas se encargan de detectar y eliminar el agente patógeno y cooperan permitiendo la comunicación célula-célula mediante receptores de superficie y mensajeros solubles denominados citocinas. La inmunidad innata es estereotipada e independiente de la naturaleza del agresor y de la existencia de contactos previos con el mismo y suele ser la primera línea de defensa. La inmunidad adaptativa es más compleja y requiere el reconocimiento de antígenos para la generación de la llamada “memoria inmunológica” (170). La respuesta innata estimula y modula la respuesta adaptativa, y la respuesta adaptativa potencia la actividad de la respuesta innata (171).

#### **3.2. Células del sistema inmunitario**

Las células del sistema inmunitario pueden dividirse, de forma general, en dos categorías funcionales según el tipo de respuesta en la que participan (172).

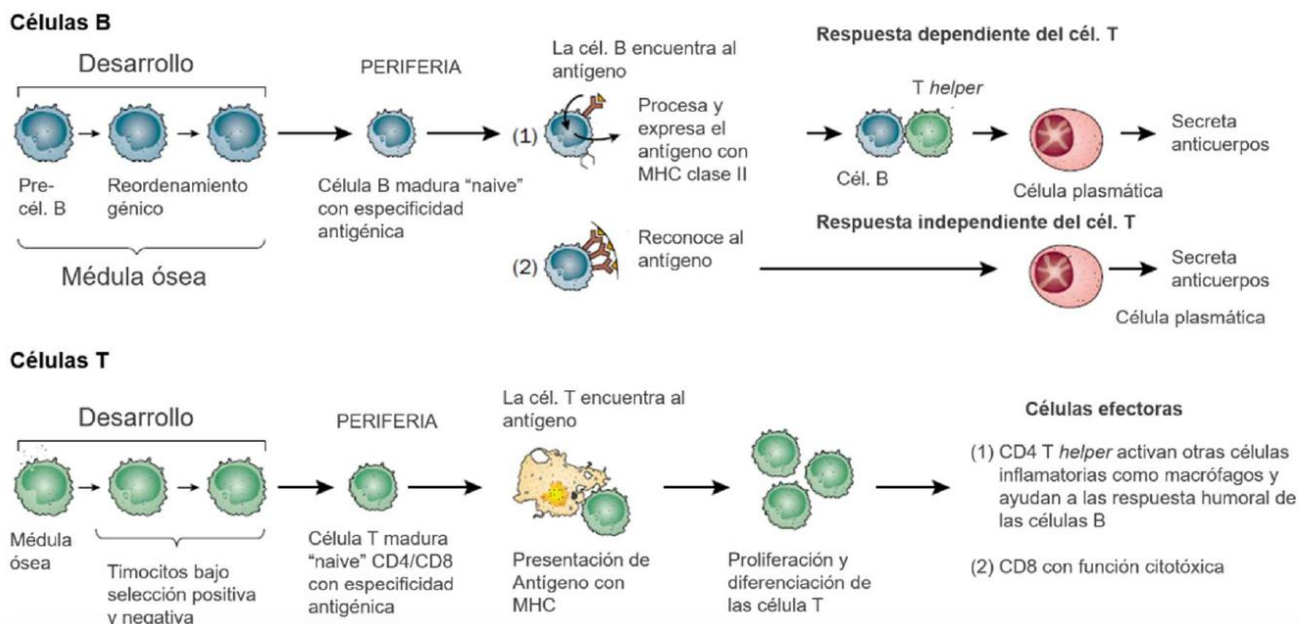
Las células que participan en la respuesta innata son las células del sistema mononuclear fagocítico (monocitos y macrófagos), los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), los linfocitos natural killer (NK), los mastocitos y las plaquetas (172).

Los monocitos de circulación periférica, los macrófagos residentes en los tejidos y los granulocitos polimorfonucleares (especialmente los neutrófilos) se encargan de la fagocitosis, principalmente de microorganismos extracelulares. Los linfocitos NK participan fundamentalmente en la defensa contra microorganismos intracelulares y son responsables de la muerte de las células tumorales e infectadas por virus. Los mastocitos

y plaquetas son indispensables en la inducción y el mantenimiento de la cascada inflamatoria (173).

Un grupo especializado de células denominado CPA, sirve de puente entre la respuesta innata y la adaptativa. Engloban las células dendríticas, las células del sistema monocito-macrófago y los linfocitos B. Expresan en su superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y actúan para presentar a los linfocitos T *helper*, los antígenos captados y procesados por las propias CPA (171).

Las células encargadas de la respuesta adaptativa son los linfocitos. Tanto los linfocitos B como los linfocitos T reconocen a los antígenos a través de receptores específicos. Se forman en la médula ósea, maduran en los órganos linfáticos primarios y, una vez completan su diferenciación independiente de antígeno, emigran a través del torrente sanguíneo hasta los órganos linfáticos secundarios donde ejercen sus funciones, pasando de ser linfocitos *naive* a linfocitos efectores tras el reconocimiento del antígeno específico. Los linfocitos B y T efectores, serán los responsables de las respuestas inmunitarias humoral y celular, respectivamente (174) (Figura 6).



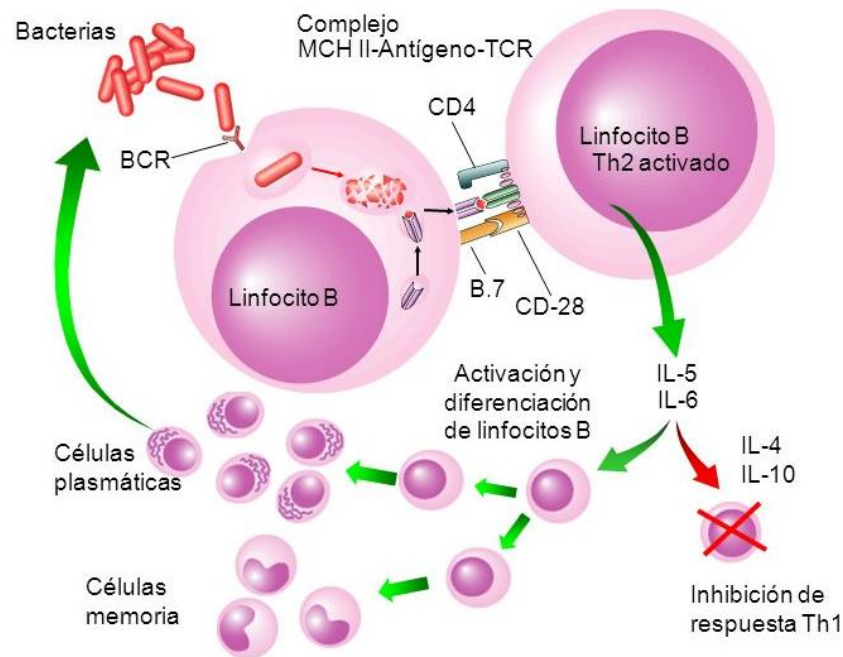
**Figura 6.** Esquema del desarrollo de los linfocitos B y linfocitos T (174). MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

### 3.2.1. Linfocitos B: respuesta humoral

Los linfocitos B se forman y maduran en la médula ósea, desde donde se trasladan a los ganglios linfáticos y al bazo para ejercer sus funciones. Los linfocitos B ejercen su acción contra los antígenos mediante la secreción de Ig, encargadas de neutralizar toxinas, prevenir la adherencia de los microorganismos a las mucosas, activar el complemento, ayudar en la fagocitosis y en la citotoxicidad. Antes de que se produzca el contacto, las Ig (fundamentalmente IgM) sólo se expresan en la membrana del linfocito y constituyen el receptor antigénico de la célula B, gracias al cual ésta reconoce su antígeno específico. Una vez maduran, pueden expresar otras Ig de superficie como IgD. Una vez reconocido el antígeno, el linfocito B se activa y las Ig específicas contra el antígeno se secretan como factores solubles o anticuerpos. La activación del linfocito B puede precisar, o no, la ayuda de linfocitos T cooperadores, lo cual depende de la naturaleza del antígeno (171):

- **Antígenos T-dependientes:** son antígenos de naturaleza proteica y precisan de la colaboración de los linfocitos T *helper*. El linfocito B toma contacto con el antígeno a través del receptor antigénico de célula B, endocita el antígeno y, tras procesarlo, actúa como CPA mostrando el péptido antigénico, unido a una molécula del MHC de clase II, a linfocitos T *helper* para que lo reconozcan mediante el receptor antigénico de células T (TCR). Para que se produzca la activación del linfocito T *helper* se requiere la interacción del TCR de la célula T y el complejo péptido antigénico-molécula MHC de clase II, expresado en la membrana de los linfocitos B, la unión de las moléculas del MHC de clase II con la molécula CD4 del linfocito T y la interacción de la molécula coestimuladora B7 expresada en la membrana de los linfocitos B, con su correspondiente ligando expresado en la membrana de los linfocitos T (CD28) (Figura 7). La activación del linfocito B supone, al igual que la del linfocito T, la génesis de señales intracelulares y la activación de factores de transcripción que inducen su proliferación y diferenciación clonal, resultando un clon de células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Las citocinas de patrón Th2 y la interacción CD40-CD40L contribuyen a activar el linfocito B, pero además inducen un cambio de clase de anticuerpo, secretándose, además de IgM, IgG y pequeñas cantidades de IgA e IgE, y facilitan la selección de linfocitos B secretores de anticuerpos con

mayor especificidad antigénica dando lugar a linfocitos B de memoria con un receptor de membrana que reconocerá el mismo antígeno en un nuevo contacto.



**Figura 7.** Activación de los linfocitos B dependiente de células T.

- **Antígenos T-independientes:** son antígenos no proteicos como polisacáridos de membrana o glucolípidos. Se unen con el linfocito B y ello es suficiente para que éste se active, prolifere y secrete anticuerpos. Los antígenos no proteicos no activan a los linfocitos T y por ello no se produce cambio de clase de Ig, maduración de la afinidad ni memoria inmunológica.

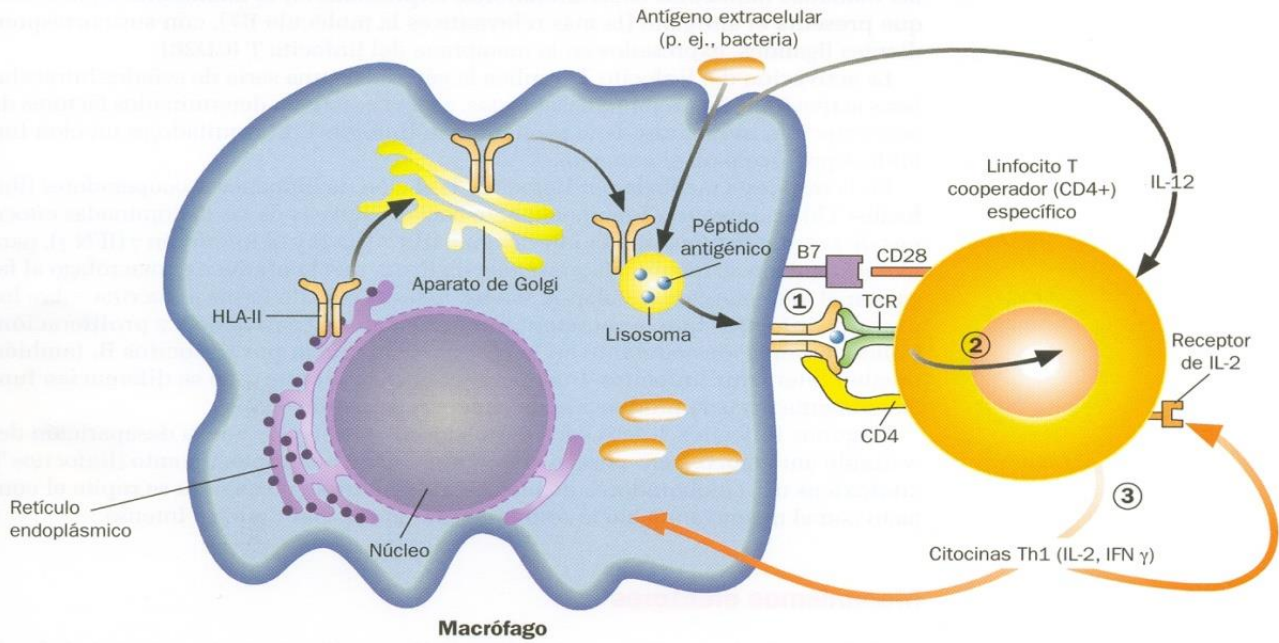
### 3.2.2. Linfocitos T: respuesta celular

Los linfocitos T se forman en la médula ósea, pero a diferencia de los linfocitos B, maduran en el timo, desde donde se trasladan a los ganglios linfáticos y al bazo para ejercer sus funciones. De los muchos linfocitos T que se forman en el timo, solo sobreviven aquellos que disponen en su membrana de un receptor antigénico que no reconoce específicamente los antígenos del propio individuo pero sí sus moléculas de clase I y de clase II del MHC. Al mismo tiempo, la diferenciación determina cambios en otras moléculas de la membrana celular, de manera que, finalmente, todos los linfocitos

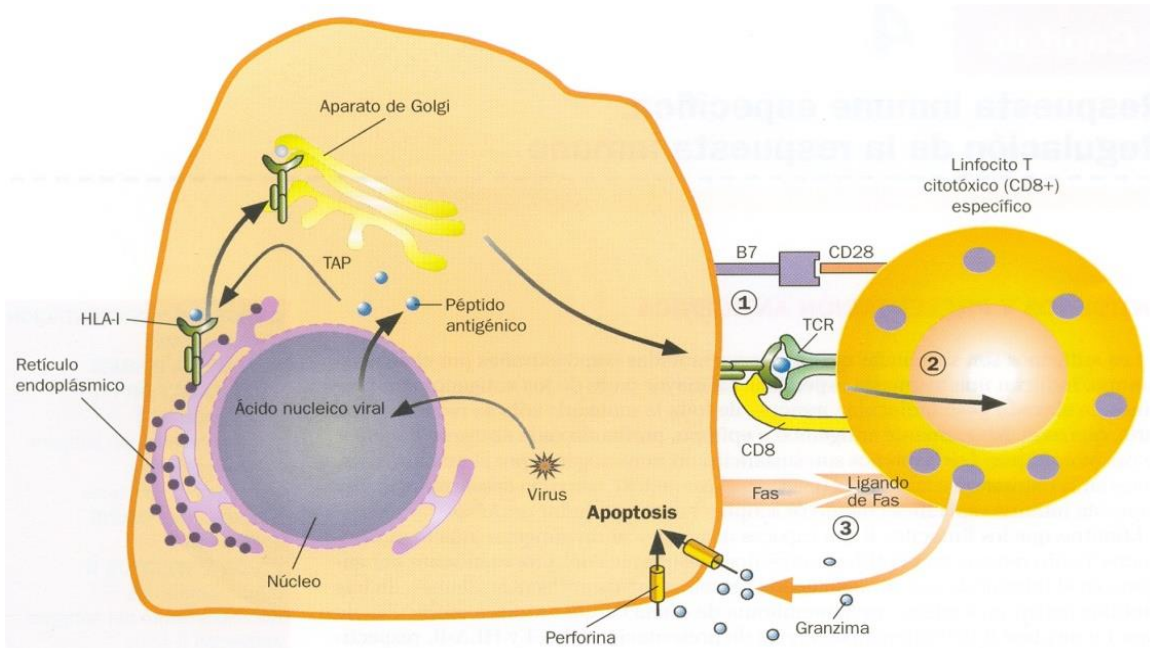
supervivientes expresan la molécula CD3, que se halla junto al TCR. Además, los linfocitos maduros pueden expresar la molécula CD4 o CD8, pero no las dos; ello permite diferenciar dos grandes subpoblaciones linfoides, cuya capacidad de reconocimiento y de actuación frente al antígeno son diferentes (171):

- **Linfocitos T CD4 o T *helper*:** su receptor antigénico solo reconoce los péptidos antigénicos específicos derivados de antígenos extracelulares, una vez se han unido a una molécula del MHC de clase II. Intervienen en las reacciones inmunitarias frente a antígenos extracelulares y juegan un papel fundamental en la activación de otros tipos celulares, entre los que destacan los linfocitos B (Figura 8).
- **Linfocitos T CD8 o T citotóxicos:** su receptor solo reconoce los péptidos antigénicos específicos procedentes del procesamiento de antígenos intracelulares unidos con una molécula del MHC de clase I. Intervienen en las reacciones inmunitarias frente a antígenos intracelulares con actividad antiviral y antitumoral al inducir la muerte de la célula diana a través de una serie de enzimas como las perforinas o granzimas (Figura 9).

Los linfocitos se consideran inmunológicamente *naive* hasta el momento en que se produce la interacción entre el TCR y el complejo péptido antigénico-molécula del MHC apropiada, la unión de la molécula de clase II o I con las moléculas CD4 o CD8 del linfocito y la interacción de las llamadas moléculas coestimuladoras, expresadas en la membrana de la célula que presenta el antígeno (B7), con sus correspondientes ligandos, expresados en la membrana del linfocito T (CD28).



**Figura 8.** Esquema de la presentación de antígeno vía molécula del MHC de clase II y la respuesta inmune mediada por linfocitos T *helper*.



**Figura 9.** Esquema de la presentación de antígeno vía molécula del MHC de clase I y la respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos.

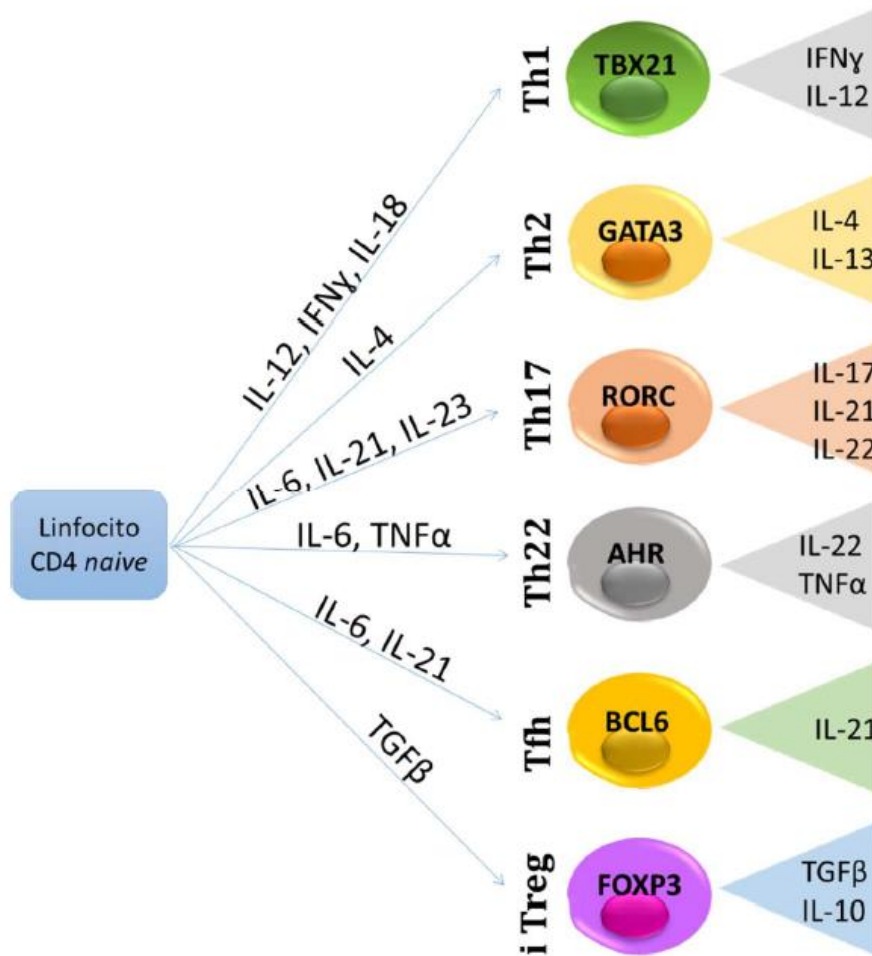
La mayoría de los linfocitos CD4 son CD28+ y requieren la participación del CD28 como coestimulador. Sin embargo, hay una población de CD4 que son CD28- con capacidad citotóxica sin necesidad de estimulación por una CPA. Esta subpoblación puede secretar grandes cantidades de factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) promoviendo un ambiente proinflamatorio (175-176). Además, se diferencian de las células CD4+CD28+ en que expresan en su membrana el receptor CX3CR1 por lo que mediante quimioatracción pueden migrar a sitios con un alto gradiente de CX3CR1 (176). Esta población se ha visto implicada en procesos inflamatorios de varias enfermedades autoinmunes entre las que destaca la esclerosis múltiple (177). Los CD8 también pueden carecer de la molécula coestimuladora CD28. Esta subpoblación se caracteriza por una baja capacidad proliferativa y son llamadas CD8 reguladoras. Tienen capacidad supresora como las CD4 reguladoras pero se diferencian en que funcionan a través de la acción de mediadores solubles como la IL-10 y el factor de crecimiento transformador beta (TFG $\beta$ ) (178).

La activación del linfocito T implica la génesis de señales intracelulares activadoras de proteincinasas; estas a su vez, activan determinados factores de transcripción, inductores de la proliferación linfoide T. El resultado es un clon linfoide específico para el antígeno. Algunos linfocitos T activados permanecen quiescentes tras la desaparición del estímulo antigénico pero poseen memoria de dicho acontecimiento (linfocitos T citotóxicos o *helper* de memoria), de forma que cuando se repite el contacto con el mismo antígeno la respuesta inmune es más rápida e intensa (171).

#### *Diferenciación de los linfocitos T helper*

Los linfocitos T *helper*, inducidos por IL concretas, se diferencian hacia distintos subtipos celulares dando lugar a un factor de transcripción característico y a la producción de citocinas específicas de cada subpoblación (179-180) (Figura 10).





**Figura 10.** Linfocitos T *helper* efectores. Se muestran las interleucinas que inducen la diferenciación celular, el factor de transcripción característico y la producción de las principales citoquinas por cada subpoblación.

Además, cada subtipo celular desempeña unas funciones diferentes (179-180):

- **Th1:** actúan contra infecciones bacterianas y reconocen agentes infecciosos intracelulares. Producen IL que inducen la proliferación de otras células T como las citotóxicas. Son productoras de IFN $\gamma$  que activa macrófagos para eliminar patógenos intracelulares como micobacterias, hongos o protozoos para lo cual también requiere de IL-12.
- **Th2:** actúan contra patógenos extracelulares, helmintos y alergias. Produce IL-4, IL-5 e IL-13 que favorecen la producción de anticuerpos y la expansión de

eosinófilos. 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 $\alpha$  e IL-6.

- **Th17:** actúan en la defensa contra patógenos, sobre todo bacterias extracelulares y hongos, y desencadenan reacciones inflamatorias en enfermedades autoinmunes (181). Producen principalmente IL-17, capaz de provocar una reacción inflamatoria masiva debido a la gran distribución de sus receptores. Se han detectado receptores en casi todos los tipos celulares del hígado, incluyendo hepatocitos, células de Kupffer, células epiteliales biliares y endoteliales. Pueden alterar la integridad de la BHE a través del aumento de especies reactivas de oxígeno y la disminución del número de proteínas de unión entre las células endoteliales de la BHE (182).
- **Th22:** expresan en la membrana el receptor CCR6, cuyo ligando, el CCL20, atrae por quimioatracción a estas células hacia epitelios inflamados lo cual le confiere su papel en diferentes enfermedades inflamatorias (183). Se definen por la producción de IL-22, aunque esta también puede ser producida por linfocitos Th17, Th1 y algunas células no linfoides.
- **T helper foliculares o Thf:** su función principal es ayudar a los linfocitos B con la producción de anticuerpos. Inducen y controlan los cambios en la trasposición e hipermutación somática de la formación de Igs, principalmente en los centros germinales. Producen IL-21, encargada de estimular la diferenciación de los linfocitos B en células formadoras de anticuerpos a través del receptor de IL-21.
- **T reguladoras o Treg:** su 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 inmunológica (184) o la restauración cognitiva de ciertas enfermedades que cursan con inflamación como el daño hepático o la enfermedad de Alzheimer (185). Secretan principalmente TFG $\beta$  e IL-10, aunque no son específicas de este tipo celular.

### 3.2.3. Monocitos y macrófagos

Los monocitos se encargan de mediar la inflamación y la defensa innata. Se han definido tres subtipos en sangre periférica en función de los marcadores de superficie CD14 y CD16 (186):

- **CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> o clásicos:** tienen actividad fagocítica y antimicrobiana pero una baja producción de citocinas. Constituyen el 90-95% de los monocitos circulantes.
- **CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> o intermedios:** tienen actividad proinflamatoria y producen activamente TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23. Constituyen sobre un 5% de los monocitos circulantes.
- **CD14<sup>-</sup>CD16<sup>++</sup> o alternativos:** tienen actividad antiinflamatoria y producen principalmente IL-10. Constituyen el otro 5% de los monocitos circulantes.

En condiciones de inflamación, los monocitos migran desde la sangre al tejido por quimioatracción mediada a través de factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias. Una vez en el tejido se diferencian en macrófagos, que en función del ambiente tendrán una activación (187):

- **“Clásica” o proinflamatoria (M1):** se diferencian en presencia de INF $\gamma$  o TNF $\alpha$  (188).
- **“Alternativa” o antiinflamatoria (M2):** se diferencian en presencia de IL-4, IL-13 o IL-10 (189).

Una vez en el órgano diana los macrófagos interactúan con los linfocitos T para activarlos y, a su vez, las citocinas producidas por los linfocitos los activan. Con ello, los macrófagos producen metabolitos secundarios como el óxido nítrico, que pueden matar a las células de su alrededor para fagocitarlas y presentar esas mismas proteínas a los linfocitos.

### **3.3. Factores implicados en la respuesta inflamatoria**

#### **3.3.1. Marcadores de inflamación: CD69**

El CD69 es un receptor de membrana de leucocitos implicado en la transducción de señales en los procesos de inflamación. Es considerado en general como un marcador de activación precoz leucocitaria. Actúa como regulador negativo en la diferenciación de linfocitos proinflamatorios Th17 (190) y tiene un papel fundamental en la generación y mantenimiento de los linfocitos T de memoria encargados de facilitar la inmunidad humoral en fase tardía (191).

#### **3.3.2. Mediadores de la inflamación: citocinas**

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares. Dentro de las citocinas se incluyen las IL, los TNF, los INF, los factores estimuladores de colonias y las quimiocinas. Actúan como reguladoras de la respuesta inmunitaria, sistémica y local, a través de su interacción con receptores de membrana específicos que desencadenan una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula diana que, a su vez, determina la acción biológica. Pueden inducir o suprimir su propia síntesis o la de otras citocinas o sus receptores y pueden favorecer de manera sinérgica la acción de otras citocinas o actuar como antagonistas de sus efectos. Desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio que es definido por el balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Intervienen como factores de crecimiento de distintas células, entre las cuales están las células hematopoyéticas (192).

##### *Citocinas proinflamatorias*

Las principales citocinas proinflamatorias son el TNF $\alpha$ , la IL-6, la IL-1, la IL-12 y la IL-18. También el INF $\gamma$  o algunas IL específicas de ciertos procesos inflamatorios como la IL-17, IL-21 e IL-23 y la citocina CCL20:

- El TNF $\alpha$  es producido principalmente por monocitos, macrófagos, linfocitos T, neutrófilos, mastocitos y células endoteliales (193). Ejerce un efecto antitumoral a través de un doble mecanismo que incluye la inhibición de la angiogénesis y el aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral. Al mismo tiempo, actúa como

mediador del desarrollo del shock séptico e induce diversas moléculas de adhesión, lo cual acelera la atracción de leucocitos inflamatorios al lugar del daño y la liberación de más TNF $\alpha$  (194).

- La **IL-6** es producida por fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y linfocitos. Interviene regulando la respuesta inmunológica con propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias. Su liberación es inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF $\alpha$ . A su vez, es capaz de promover la síntesis del antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra) y de los receptores solubles del TNF $\alpha$  (195).
- La **IL-1** es producida por monocitos, macrófagos y células dendríticas en respuesta a la liberación de TNF $\alpha$ . Existen 2 isoformas denominadas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Ambas actúan sobre el mismo receptor, por el que también compite el IL-1ra. La IL-1 $\beta$  es la forma predominante y está implicada en la patogénesis de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide (196).
- La **IL-12** es producida por monocitos, macrófagos y linfocitos B. Promueve la inmunidad celular activando las células Th1, lo cual induce la síntesis de INF $\gamma$  e IL-2 por parte de los linfocitos T (197).
- La **IL-15** interviene en la inmunidad innata mediada por neutrófilos, monocitos/macrófagos y NK, y en la inmunidad adaptativa mediada por linfocitos T y B. Inhibe la apoptosis y actúa sobre células que no pertenecen al sistema inmunitario. Es un excelente adyuvante para su incorporación en vacunas contra agentes infecciosos. Su expresión incontrolada se relaciona con enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple (198).
- La **IL-18** es producida por monocitos y macrófagos. Estimula la producción del INF $\gamma$  de forma sinérgica con la IL-12, probablemente debido al aumento de receptores para la IL-18 producido por la IL-12. Igualmente, la IL-18 aumenta la producción de IL-2 con lo que participa en la regulación de la respuesta Th1 (199).

- El **INF $\gamma$**  es otra citocina producida por los linfocitos T y NK activados e interviene principalmente en la activación de macrófagos. Tiene actividad antiviral y antineoplásica mediada por la respuesta Th1 (192).
- La **IL-17** es producida principalmente por los linfocitos Th17. Estimula la producción de otras citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y otras moléculas por parte de células epiteliales, endoteliales y fibroblastos que mantienen niveles de inflamación elevados. Juega un papel importante en enfermedades de carácter autoinmune como la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple (200-201).
- La **IL-21** es producida principalmente por los linfocitos Thf aunque también por los Th1. Una de sus funciones principales es la activación de los linfocitos B. También contribuye a la proliferación y actividad citotóxica de los CD8, a la maduración funcional de los NK y a la activación de los monocitos (202-203).
- La **IL-22** es producida fundamentalmente por linfocitos Th-17. Se dirige principalmente a las células epiteliales donde desempeña un papel en la regeneración de tejidos y en la defensa del huésped en las superficies de barrera. Se ha relacionado con varias afecciones que involucran patología tisular inflamatoria (204).
- La **IL-23** es producida por las células dendríticas y macrófagos. Regula la proliferación de los Th17 e induce a los CD8 a proliferar y producir IL proinflamatorias (192).
- El **CXCL13** y su receptor CXCR5 desempeñan funciones en la respuesta inflamatoria, infecciosa e inmunitaria. Identificado como quimioatrayente de linfocitos B, ha sido implicado en la patogénesis de enfermedades autoinmunes, inflamatorias y trastornos linfoproliferativos (205).
- El **CX3CL1** puede existir en forma soluble como quimiotáctica o unida a la membrana celular como molécula de unión. Ha sido implicada en enfermedades inflamatorias y cáncer con consecuencias tanto negativas como positivas (206).

- El **CCL20** es una quimiocina con gran capacidad quimiotáctica para linfocitos. Es inducida por factores microbianos como el lipopolisacárido y por citocinas inflamatorias como el  $\text{TNF}\alpha$  y el  $\text{IFN}\gamma$ , mientras que es inhibida por la IL-10. Se expresa en nódulos linfáticos, células endoteliales y hepáticas. Se une al receptor CCR6 y provoca una atracción dependiente de gradiente de las células que expresan dicho receptor como las Th17 y Th22. Tanto el CCL20 como el CCR6 se han descrito en enfermedades hepáticas como el CHC; no obstante, su papel en la hepatopatía crónica no está claro (207).

#### *Citocinas antiinflamatorias*

Las principales IL antiinflamatorias son la IL-4, IL-10 e IL-13, el IL-1ra, los receptores solubles de la IL-1 (p68) y del  $\text{TNF}\alpha$  (p55 y p75). También el  $\text{TFG}\beta$ , aunque tiene funciones aparentemente contrarias en función de su concentración:

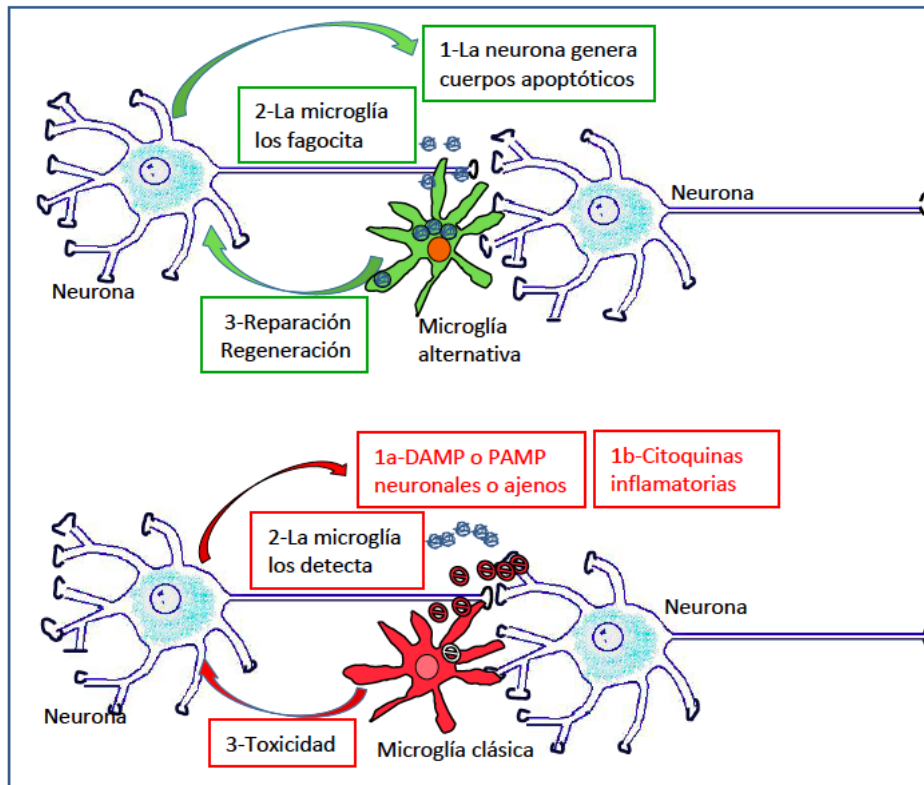
- La **IL-4** tiene su origen en los linfocitos Th2. Promueve la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Es responsable del control de la inflamación a nivel cerebral mediante la reducción de la ciclooxigenasa 2 y del  $\text{TNF}\alpha$  e IL-1 $\beta$  por la microglía activa (208).
- La **IL-10** es producida principalmente por los linfocitos Th2. Es la principal citocina antiinflamatoria, acción que ejerce a través de la inhibición de la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF por parte de los macrófagos (192).
- La **IL-13** es producida por las células T. Regula la función de monocitos y células B y disminuye la producción de IL proinflamatorias y de quimiocinas, a la vez que aumenta la producción de IL-1ra (192).
- El **TFG $\beta$**  es una proteína multifuncional que controla la proliferación y diferenciación de múltiples tipos celulares que la sintetizan y tienen receptores para ella. A altas concentraciones suprime la expresión de la IL-17 favoreciendo el desarrollo de las Treg. A bajas concentraciones, junto con la 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 Treg (209).

### **3.4. Sistema inmunitario cerebral**

El cerebro tiene su propio sistema inmunitario formado por las células de la microglía. Éstas son un tipo de macrófago con función fagocítica capaz de activarse tanto por factores del sistema nervioso central (SNC) como del sistema de inmunidad periférica (210).

La microglía retira restos de tejido dañado, puede ejecutar labores de reparación de tejido y secretar factores neurotróficos y de protección. Por el contrario, si la activación es excesiva, el efecto puede ser perjudicial al secretar citocinas inflamatorias y liberar radicales libres que pueden resultar tóxicos para las neuronas (211). Este papel dual de la microglía es similar al de los macrófagos. Diferentes estímulos como la presencia de citocinas inflamatorias, de patógenos tipo vírico, bacteriano o fúngico, inducen la activación “clásica” que da lugar a la secreción de citocinas proinflamatorias ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ), la liberación del neurotransmisor glutamato y un exceso de especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, estímulos como las citocinas antiinflamatorias, la fagocitosis de cuerpos apoptóticos o la presencia de helmintos, inducen una activación “alternativa” de la microglía con un papel beneficioso y neuroprotector encargado de la limpieza del material tóxico (neuronas apoptóticas o agregados proteicos), la secreción de factores neurotróficos y protectores como el glutatión y la retirada del neurotransmisor glutamato (212) (Figura 11).

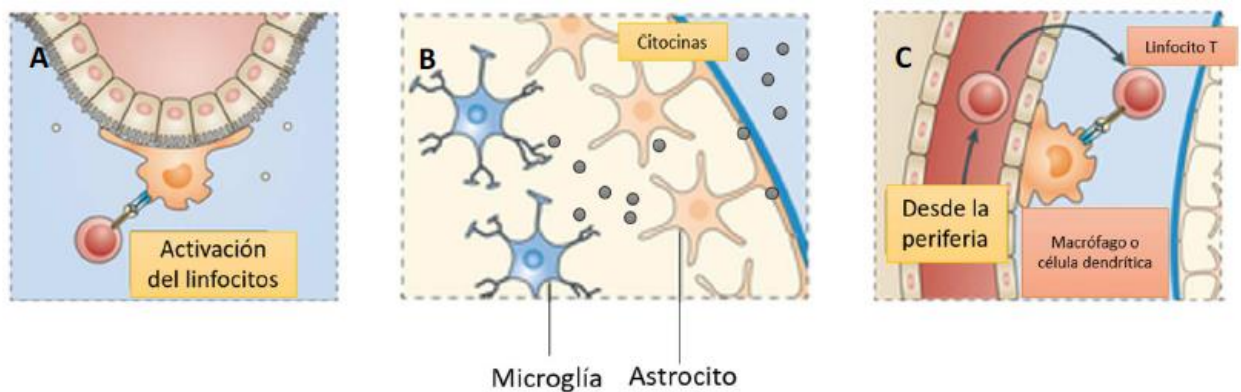




**Figura 11.** Esquema de activación de la microglía. La microglía “alternativa” se induce en situación de salud, fagocitando cuerpos apoptóticos y enviando señales de reparación y regeneración. La microglía “clásica” se induce al detectar algo ajeno (PAMP) o dañino (DAMP) y envía señales neurotóxicas.

La BHE es una barrera estructural y funcional que brinda protección al SNC. Está compuesta por células endoteliales, íntimamente unidas por uniones estrechas que pueden interactuar con los astrocitos del SNC. En condiciones normales, además de sustancias liposolubles, gases y agua que entran por difusión simple a través de la BHE, existe un transporte activo para ciertas moléculas como electrolitos, glucosa y aminoácidos. Además, la ausencia de sistema linfático, la baja expresión de moléculas capaces de presentar antígenos a los linfocitos T y las citocinas inmunosupresoras que secretan los astrocitos que recubren y contactan con la BHE, hacen que el cerebro se mantenga inmuno-inhibido (213-214).

En condiciones patológicas, la inflamación periférica se comunica con el cerebro e induce una respuesta en su sistema inmunitario. En los órganos circunventriculares se han detectado receptores tipo Toll y receptores de IL que se activan tras el reconocimiento de agentes patógenos o citocinas específicas. La señalización de citocinas por vías neurales y humorales activa la microglía, la cual induce y propaga la señal de estas, dando lugar a un aumento en la permeabilidad de la BHE, que facilita, a su vez, la entrada linfocitos T y monocitos de la sangre (215-216) (Figura 12).



**Figura 12.** Relación entre el sistema periférico y el SNC.

A: Activación de linfocitos a través de los receptores tipo Toll de órganos circunventriculares;  
B: Activación de la microglía del SNC a través de citocinas de la periferia; C: Infiltración de leucocitos de la periferia.

## **4. SISTEMA INMUNITARIO EN LA CIRROSIS HEPÁTICA**

### **4.1. Contribución del hígado a la homeostasis del sistema inmunitario**

El hígado regula la homeostasis del sistema inmune a través de dos mecanismos:

- Juega un papel esencial en la vigilancia inmunológica tolerando el paso de material exógeno no patógeno, al mismo tiempo que evita la propagación sistémica de patógenos que llegan del tubo digestivo. Esto se realiza a través de poblaciones residentes de CPA y linfocitos. Las CPA hepáticas incluyen las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales, que constituyen el sistema retículo-endotelial hepático, y las células dendríticas. Además, el hígado contiene poblaciones de linfocitos T y B dispersos por todo el parénquima y espacios porta, encargados de la respuesta inmune adaptativa y es rico en linfocitos NK implicados en la respuesta innata (217-218).
- El segundo mecanismo es la síntesis, principalmente por parte de los hepatocitos, de moléculas solubles esenciales tanto en la inmunidad innata como adaptativa, incluyendo componentes del complemento y receptores de reconocimiento de patrones (219).

### **4.2. Síndrome de disfunción inmunitaria asociada a la cirrosis**

La cirrosis hepática es una enfermedad crónica que, a medida que progresa, da lugar al conocido como síndrome de disfunción inmunitaria asociada a la cirrosis (220). Este concepto implica un deterioro de los sistema inmune innato y adaptativo, que conduce a una inmunodeficiencia tanto local como sistémica, y a un estado de inflamación crónica, que da lugar a la progresión de la fibrosis, de la HTP, a la aparición de EH y eventualmente a un fallo hepático agudo sobre crónico (220-221).

#### 4.2.1. Inmunodeficiencia inducida por la cirrosis

La inmunodeficiencia de la cirrosis resulta del daño en la función de vigilancia inmunitaria local hepática, de la síntesis reducida de proteínas implicadas en la inmunidad y del daño en las células encargadas de la respuesta inflamatoria sistémica (222).

La función de vigilancia inmunitaria se ve comprometida por un sistema retículo-endotelial dañado por la fibrosis sinusoidal y septal con derivaciones porto-sistémicas y pérdida de células de Kupffer. Este trastorno estructural reduce la eliminación de endotoxinas y bacterias de la sangre, dando lugar a bacteriemia y estimulación persistente del sistema inmune (222).

Al mismo tiempo, el deterioro en la síntesis de proteínas implicadas en la inmunidad innata y de receptores de reconocimiento de patrones, reduce la capacidad bactericida de las células dendríticas (222).

La cirrosis hepática también altera la función de las células inmunitarias a nivel sistémico de manera que:

- Los **neutrófilos** ven reducido su número debido al secuestro por el bazo y presentan una fagocitosis y capacidad de quimiotaxis al foco de infección alteradas (223).
- Los **monocitos** ven alterado su número, distribución y función. Es frecuente observar una monocitosis con un aumento a expensas de monocitos pro-inflamatorios no-clásicos CD14+CD16+ (224).
- Los **linfocitos B** también se ven reducidos en la cirrosis, con una pérdida predominante de linfocitos B de memoria (225).
- También es típica la linfopenia de **células T** y afecta tanto a células T colaboradoras como citotóxicas, preferentemente *naïve* (226).

- Las **células NK** son defectuosas y presentan una respuesta pobre a la estimulación con citocinas. Esto es más evidente a nivel intrahepático, donde las células NK desempeñan un papel importante en el alivio de la fibrogénesis (227).

Otro órgano inmune afectado en la cirrosis es el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal, que constituye la primera barrera de defensa contra antígenos y patógenos que alcanzan el organismo a través del tracto gastrointestinal. En la cirrosis, este tejido está bajo presión constante debido al aumento de la translocación bacteriana, lo cual da lugar a un mayor número de monocitos activados, células dendríticas y linfocitos T, que provocan un aumento de citocinas pro-inflamatorias e inflamación sistémica (228-229).

#### **4.2.2. Inflamación sistémica inducida por la cirrosis**

La inflamación sistémica que acompaña a la inmunodeficiencia se atribuye a la estimulación persistente de las células inmunes por PAMPs y DAMPs desde una barrera intestinal permeable y un hígado dañado, respectivamente (121-122). La inflamación se define por una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias, un aumento en sus niveles séricos y una mayor expresión de marcadores de activación celular. Los fenotipos de disfunción inmunitaria asociados a la cirrosis representan los extremos de un espectro de eventos dinámicos y reversibles que tienen lugar durante el curso de la enfermedad. Bajo el desafío constante de PAMPs y DAMPs, el patrón de respuesta inmune pasa de ser predominantemente proinflamatorio en pacientes con cirrosis compensada, a predominantemente inmunodeficiente en pacientes con cirrosis descompensada y fallo hepático. Este fenotipo inmunodeficiente se relaciona con un aumento en el riesgo de infecciones bacterianas, las cuales, a su vez, contribuyen a la exacerbación de la cascada inflamatoria, al desarrollo de EH y a un aumento de la mortalidad (220-221).



## **II. JUSTIFICACIÓN**





Hasta el 80% de los pacientes con cirrosis hepática sin síntomas clínicos evidentes de EH presentan EHM (50-53). La EHM reduce la calidad de vida de los pacientes, predispone al desarrollo de EHC, empeora el pronóstico de la enfermedad y reduce la supervivencia (69-72).

El diagnóstico de la EHM no se realiza de forma rutinaria en la mayoría de centros debido a la falta de procedimientos aplicables en la práctica clínica y a que pacientes clasificados como “sin EHM” mediante los test de referencia PHES, pueden tener déficits neurológicos (89-90). Al mismo tiempo, la respuesta inflamatoria parece tener un papel esencial en la patogenia de la EHM pero todavía no está bien definido (123-125). Así pues, será importante determinar los factores de riesgo de EHM, caracterizar correctamente las alteraciones cognitivas y funcionales y su relación con los parámetros inflamatorios para el diagnóstico precoz de la enfermedad.

El tratamiento temprano con rifaximina ha demostrado mejorar las alteraciones neurológicas y la calidad de vida, con una buena tasa de adherencia y de efectos secundarios (167-168). No obstante, se desconoce el mecanismo de acción de este fármaco en la EHM. Es, por tanto, necesario estudiar el efecto de la rifaximina sobre la evolución de la enfermedad y los parámetros inflamatorios para establecer qué grupo de pacientes podrá beneficiarse de su administración.



### **III. HIPÓTESIS**



Ha sido demostrado que en la EH existe un componente inflamatorio que interviene en su patogenia. Sin embargo, este aspecto no se ha estudiado ampliamente en la EHM donde es más difícil establecer un diagnóstico de certeza. Por ello, pensamos que caracterizar con precisión las alteraciones cognitivas y funcionales y establecer en esos casos los parámetros inflamatorios asociados, mejorará el conocimiento de la EHM y contribuirá al desarrollo de un método diagnóstico válido, objetivo, reproducible y sencillo que pueda ser utilizado en la práctica clínica para el diagnóstico precoz de la enfermedad.

Por otra parte, los efectos de la rifaximina en la EH son conocidos. Por ello, establecer si este fármaco es capaz de modificar las alteraciones neurológicas e inflamatorias encontradas en pacientes con EHM cuando se les administra permitirá individualizar la indicación del tratamiento.



## **IV. OBJETIVOS**





- Caracterizar las alteraciones cognitivas y motoras asociadas a la EHM, diagnosticada en base a los criterios del PHES, mediante la aplicación de test psicométricos específicos.
- Estudiar los mecanismos implicados en la patogenia de la EHM centrándonos en los parámetros inflamatorios y su relación con las alteraciones neurológicas.
- Analizar el efecto del tratamiento con rifaximina sobre las alteraciones neurológicas y los parámetros inflamatorios en pacientes con EHM.



## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. DISEÑO**

Se diseñó un estudio multicéntrico, postautorización, de seguimiento prospectivo de una cohorte de pacientes con cirrosis hepática controlados en la Unidad de Hepatología del Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia.

## **2. POBLACIÓN**

Se incluyeron pacientes con cirrosis hepática diagnosticada por biopsia hepática o por combinación de criterios clínicos, analíticos y radiológicos que cumplieran los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

Criterios de inclusión:

- Mayores de 18 años.
- Cualquier etiología.
- Cualquier grado de función hepática.
- Que acepten y firmen el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Enfermedad neurológica o psiquiátrica.
- Consumo activo de alcohol en los últimos 6 meses.
- Adicción a drogas por vía parenteral en los últimos 6 meses.
- Episodio de EHC previo.
- Infección o uso de antibioterapia en las últimas 6 semanas (excepto profilaxis de PBE).
- Episodios de hemorragia digestiva en las últimas 6 semanas.
- Infección por el VHC bajo tratamiento antiviral.
- Portadores de TIPS.
- Diagnóstico de CHC.

Los pacientes fueron reclutados consecutivamente desde enero del 2015 hasta enero del 2019 y categorizados como con o sin EHM en función del PHES.

Se calculó el tamaño muestral para obtener una potencia estadística de al menos el 90% y un nivel de significación del 5% en el estudio de las alteraciones inmunitarias y se seleccionó de forma aleatoria un mínimo de 30 pacientes en cada uno de los brazos del estudio.

Se realizó seguimiento clínico y analítico de estos pacientes a los 3, 6 y 12 meses de la inclusión en el estudio y ecográfico a los 6 y 12 meses. Posteriormente se siguieron controles semestrales con revisión clínica, analítica y ecográfica hasta la pérdida de seguimiento, el fallecimiento o el cierre del estudio en enero del 2020. Se realizaron visitas adicionales en cualquier momento del seguimiento en caso de deterioro clínico o aparición de complicaciones de la cirrosis.

Se incluyó un grupo de 30 sujetos voluntarios sanos que cumplieran los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión durante el mismo periodo de tiempo.

Criterios de inclusión:

- Mayores de 18 años.
- Que acepten y firmen el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Enfermedad hepática.
- Enfermedad neurológica o psiquiátrica.
- Consumo activo de alcohol en los últimos 6 meses.
- Adicción a drogas por vía parenteral en los últimos 6 meses.
- Infección o uso de antibioterapia en las últimas 6 semanas.
- Episodios de hemorragia digestiva en las últimas 6 semanas.

### **3. OBTENCIÓN DE DATOS**

Los datos se obtuvieron de la historia clínica en papel y electrónica (ORION Clinic, Mizar y Abucasis) y de la entrevista directa con el paciente.

Las variables incluidas fueron:

1. Demográficas (pacientes y controles): edad y sexo.
2. Clínicas (pacientes): comorbilidades (factores de riesgo cardiovascular, cardiopatía, enfermedad pulmonar o renal crónica), edad al diagnóstico de la cirrosis, etiología, tratamiento etiológico de la misma, otros tratamientos (IBP, metformina, benzodiacepinas, BBNC, diuréticos -furosemida y/o espironolactona-, antibióticos profilácticos -quinolonas- o laxantes -lactulosa-), presencia de HTP (circulación colateral en ecografía, esplenomegalia o varices esofágicas), grado de función hepática (escalas MELD y Child-Pugh), descompensaciones (previas al inicio del estudio y a lo largo del seguimiento y tipo de descompensación), aparición de trombosis portal o CHC, pérdida de seguimiento (incluyendo el trasplante hepático) o fallecimiento.
3. Analíticas (pacientes y controles): glucemia, parámetros nutricionales, función renal, iones, función hepática y hemograma completo.

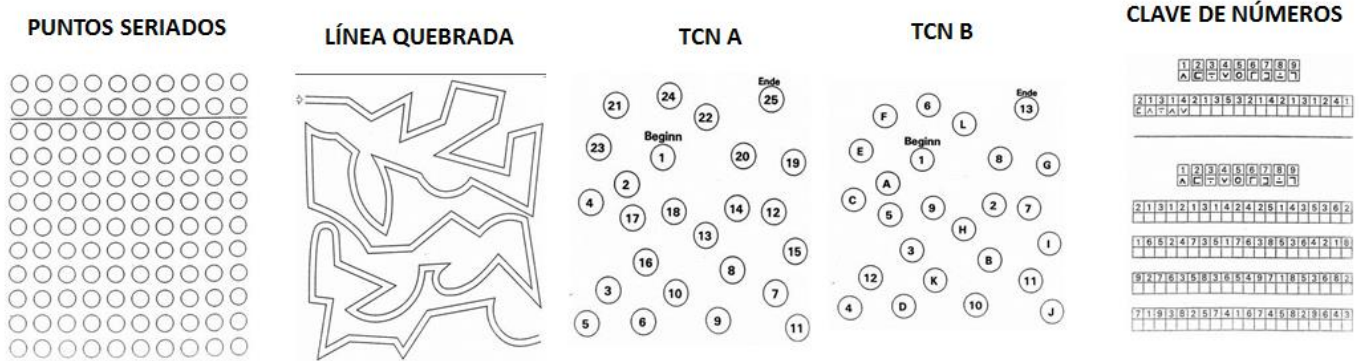
Se citó a los pacientes y a los controles para: (I) la realización de los test psicométricos; y (II) la obtención de sangre con la determinación de amonio y el estudio de las alteraciones inmunitarias.

## 4. DIAGNÓSTICO DE EHM

El diagnóstico de EHM se realizó mediante el test psicométrico de referencia PHES, compuesto por 5 subtest (Figura 13):

1. **Test de Símbolos y Dígitos (TSD):** 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. El sujeto tiene que 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 (TCN-A):** evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. Consiste en un conjunto de números (1-25) colocados de forma desordenada. El sujeto debe unir los números en orden ascendente (1-2-3...-25) trazando líneas. Se puntúa con el tiempo, en segundos, que se tarda en realizar la tarea.
3. **Test de conexión numérica B (TCN-B):** evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. Consiste en un conjunto de números (1-13) y letras (A-L), colocados de forma desordenada. El sujeto tiene que unir con líneas los números y las letras de forma alterna por orden ascendente (1-A-2-B-3...-L-13). Se puntúa con el tiempo, en segundos, que se tarda en realizar la tarea.
4. **Test de puntos seriados (TPS):** evalúa la coordinación visuoespacial. Consiste en un conjunto de círculos. El sujeto tiene que marcar con el rotulador un punto en el centro de cada uno. Se puntúa con el tiempo, en segundos, que se tarda en realizar la tarea.
5. **Test de la línea quebrada (TLQ):** evalúa la coordinación visuoespacial. Consiste en realizar un recorrido con un rotulador entre dos líneas con tramos rectos y curvos, en los que el sujeto debe evitar tocar y salirse. Se puntúa con el tiempo, en segundos, que se tarda en realizar la tarea. Para su corrección se utiliza una plantilla con el tramo recorrido dividido en cuadros para penalizar con segundos de más el número de cuadros en los que el sujeto toca o se sale del recorrido.





**Figura 13.** Batería de test psicométricos PHES.

Se llevan a cabo en 10-20 minutos. Cada prueba se puntúa según la desviación estándar de las puntuaciones medias de los controles sanos ajustada a la edad y al nivel cultural (230). Ha sido validada en varios países europeos, entre ellos España. Para el cálculo de la puntuación total, se utiliza una aplicación informática desarrollada por la Red Española de EH que utiliza los valores de referencia de la población española. Se encuentra disponible en la web [http://www.redeh.org/TEST\\_phes.htm](http://www.redeh.org/TEST_phes.htm) donde se introducen los datos de edad, nivel de estudios y la puntuación de cada test (231). La puntuación final de un paciente puede oscilar entre -18 y +16. Se considera que un individuo presenta EHM si su puntuación es -4 o inferior con una sensibilidad y especificidad del 96% y 100%, respectivamente (232).

## 5. EVALUACIÓN DE OTRAS ALTERACIONES COGNITIVAS

Además del PHES, los pacientes y controles realizaron una batería de test psicométricos específicos para evaluar otras alteraciones cognitivas.

### 5.1. Test de Stroop de colores y palabras

El test de Stroop de colores y palabras evalúa la velocidad del procesamiento y la flexibilidad cognitiva mediante el reconocimiento de un campo coloreado y un nombre de color escrito (233).

La prueba consta de 3 partes:

- **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 14A).
- **Tarea neutra:** contiene una matriz de 10 filas de cinco círculos impresos en diferentes colores (azul, rojo, amarillo, verde) (Figura 14B).
- **Tarea incongruente:** contiene una matriz de 10 filas de cinco palabras cada una con nombres de los cuatro colores impresos en tinta de diferente color al correspondiente a la palabra escrita (Figura 14C).

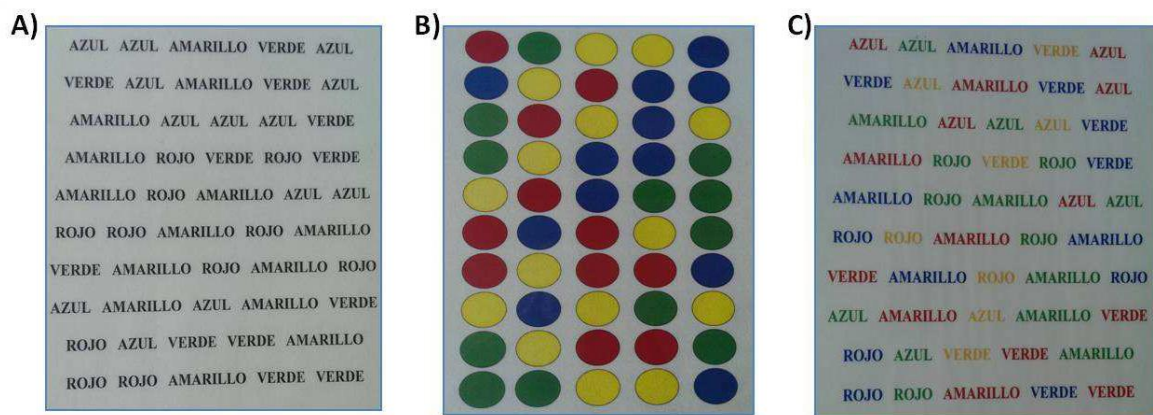


Figura 14. Test de Stroop. A: tarea congruente. B: tarea neutra. C: tarea incongruente.

El individuo dispone de 45 segundos para leer el máximo número de 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.

Se obtienen tres puntuaciones directas: número de palabras (P), número de colores (Co) y número de palabras-colores (PC). Los errores no se tienen en cuenta pero producen una puntuación directa menor al tener que repetir el ítem equivocado. Una vez obtenidos los valores P, Co y PC se corrigen según la edad del individuo si supera los 44 años (Tabla 8).

**Tabla 8.** Corrección por edad de los valores del test de Stroop.

Parámetro corregido	Adultos de 45-64 años	Adultos de 65-80 años
Palabras (P)	P + 8	P + 14
Colores (Co)	Co + 4	Co + 11
Palabras-colores (PC)	PC + 5	PC + 15

A partir de las puntuaciones corregidas se calcula un parámetro denominado “Interferencia”, que mide la capacidad del individuo para separar los estímulos de nombrar palabras y colores, 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’) con la siguiente fórmula:

$$\text{Interferencia} = PC - PC' \rightarrow PC' = (Co \times P) / (C + P)$$

Una vez obtenida la puntuación corregida de P, Co, PC y el valor de la interferencia, se interpola en una tabla normalizada para la población española con los valores correspondientes a la puntuación definitiva del test (234).

## 5.2. Test d2

El test d2 proporciona una medida concisa de la atención sostenida o concentración, 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.

En este test se reflejan tres componentes de la conducta atencional: velocidad o cantidad de trabajo realizado en un determinado tiempo; precisión o calidad de dicho trabajo y relación entre velocidad y precisión (235).

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 rayas pequeñas 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 rayas en total (las dos arriba, las dos abajo o una arriba y otra abajo). Las demás combinaciones (‘p’ con o sin rayas y ‘d’ con una, tres o cuatro rayas) se consideran irrelevantes y no deben ser marcadas (Figura 15).

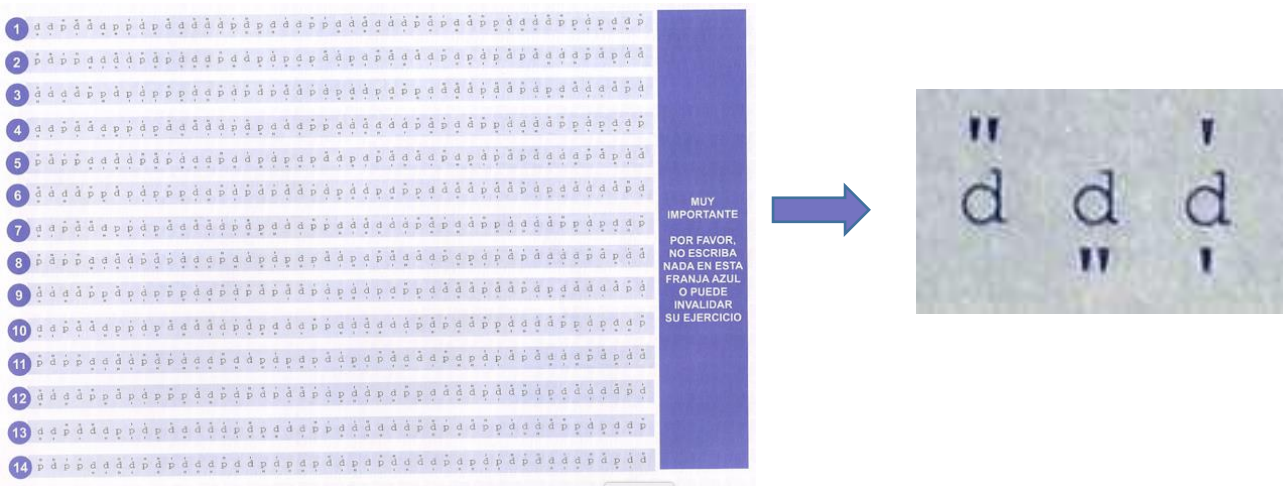


Figura 15. Test d2.

Las puntuaciones que se pueden obtener son múltiples:

- **Total de respuestas (TR):** es el número de casilla al que corresponde la última marca de cada línea. La suma del TR de las 14 líneas es una medida de la velocidad de procesamiento.
- **Total de aciertos (TA):** es el número de elementos relevantes que han sido marcados. La suma del TA de las 14 líneas es una medida de la precisión del procesamiento.
- **Omisiones (O):** número de errores por omisión o elementos relevantes no marcados hasta el último elemento marcado. Se suman las O de las 14 líneas.
- **Comisiones (C):** número de errores por comisión o elementos irrelevantes marcados hasta el último elemento marcado. La suma de C de las 14 líneas proporciona una medida del control inhibitorio.
- **Efectividad total en la prueba (TOT):** se calcula como la diferencia del TR y los errores de las 14 líneas ( $TOT = TR - (O+C)$ ).
- **Índice de concentración (CON):** se calcula como la diferencia del TA y errores por comisión ( $CON = TA - C$ ) de las 14 líneas. Este parámetro es una medida de concentración.

Una vez calculados todos los parámetros descritos, se consulta el baremo según la edad del sujeto para obtener el percentil de cada variable.

### **5.3. Test de claves oral**

Esta prueba mide la velocidad de procesamiento y atención selectiva. La tarea es muy similar al test de símbolos y dígitos de la batería PHEs, pero en el de claves oral se muestran símbolos asociados a números y el sujeto tiene que, verbalmente, relacionar en 90 segundos todos los símbolos posibles con sus números correspondientes (236) (Figura 16A).

La puntuación total es el número de aciertos que el sujeto realiza.

#### 5.4. Test de dígitos oral

Esta tarea es una sección de la batería *Wechsler Adults Intelligence Scale* y está compuesta por 2 subtest (236):

1. **Dígitos directo:** mide la atención selectiva. La prueba consiste en bloques de dos series de números, empezando por series cortas que se van alargando al pasar de bloque (Figura 16B). La tarea se realiza leyéndole al sujeto los números de la serie, que tendrán que ser repetidos por éste 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 acertadas.
2. **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 y repetirlos en orden inverso (Figura 16C). Se corrige de la misma manera que la anterior.

Se obtiene una puntuación global del test de dígitos oral sumando las dos puntuaciones.

#### 5.5. Test de letras y números oral

Este test mide la memoria de trabajo, teniendo más carga que el de dígitos oral. Se basa en bloques de tres series que contienen letras y números mezclados, y que van aumentando el número de elementos conforme avanza la prueba. Se lee la serie y el sujeto debe ordenar primero los números de forma ascendente y después las letras alfabéticamente (236) (Figura 16D). La corrección se realiza igual que en los test de dígitos orales.

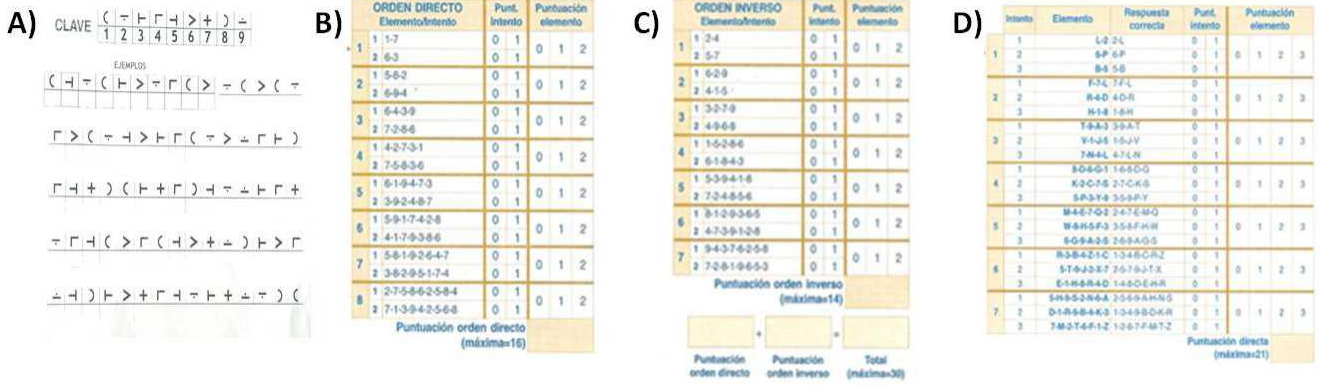


Figura 16. Test orales. A: Claves oral; B: Dígitos Directo; C: Dígitos Inverso; D: Letras y números.

## 6. EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES MOTORAS

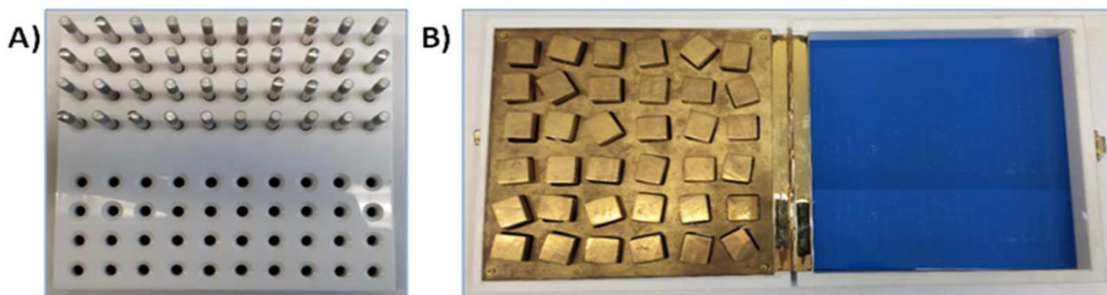
Para la evaluación de las alteraciones en la coordinación motora, se utilizaron dos test fáciles y de corta duración.

### 6.1. Test de coordinación bimanual

Este test consta de un tablero perforado con dos matrices de 4 filas con 10 agujeros cada una (Figura 17A). La prueba consiste en pasar unas clavijas metálicas de una matriz a la otra del tablero con la utilización de 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 suma el tiempo en minutos de los cuatro intentos.

### 6.2. Test de coordinación visomotora

Este test consta de 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 la mano dominante (Figura 17B). Se realiza por filas, dos veces, de izquierda a derecha y se puntúa según el tiempo que se tarda en colocar todas las piezas. Se suma el tiempo en minutos de los dos intentos.



**Figura 17.** Test de coordinación motora. A: Bimanual; B: Visomotora.

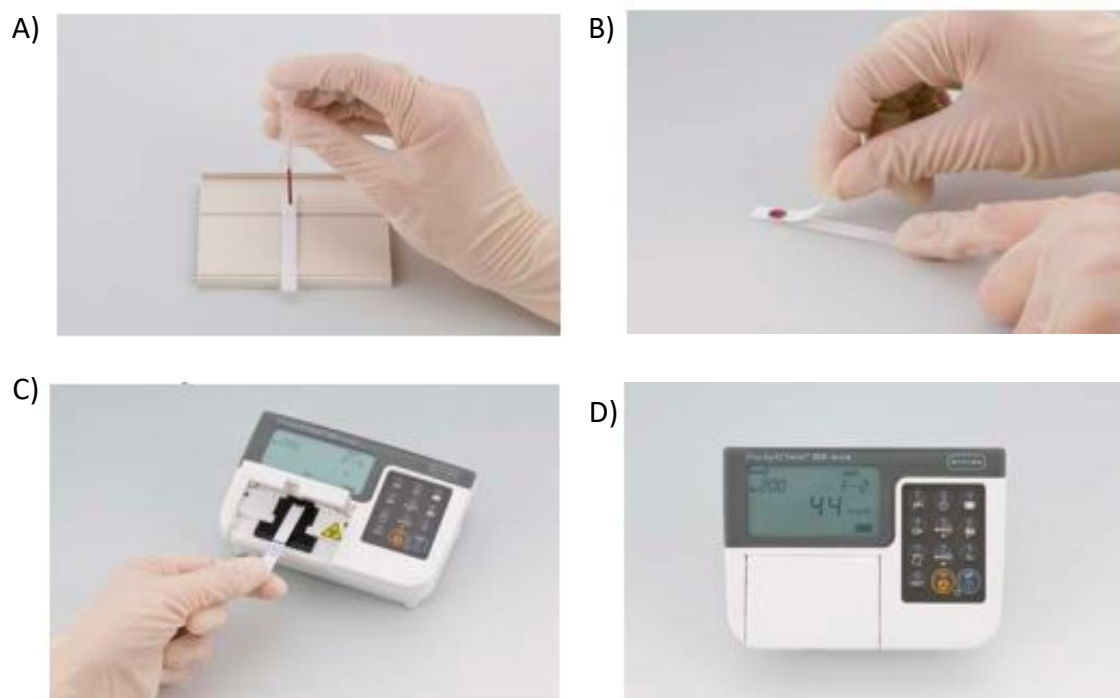


## 7. DETERMINACIÓN DE AMONIO EN SANGRE

La determinación del nivel de amonio se realizó el mismo día que los test psicométricos. Para ello se utilizó el *Ammonia Test Kit II o PocketChem BA system* (Arkray Factory, Inc., Kyoto, Japón) que mide los niveles de amonio en sangre basándose en el método de la micro-difusión. Este método tiene como ventaja que ofrece una medición rápida y exacta, requiriendo un volumen pequeño de muestra. La concentración de amonio en la muestra aumenta conforme avanza el tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre hasta la medición, por lo que la rapidez del método de medida es muy importante.

El kit del reactivo consta de 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 ( $\text{NH}_4^+$ ) de la muestra pasan a amonio gas ( $\text{NH}_3$ ) que difunde a través de los poros del distanciador al indicador (verde de bromocresol), produciendo el 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, se aplican 20  $\mu\text{l}$  de sangre total recién extraída en el centro de la capa receptora de la tira (Figura 18A). Después de 180 segundos, se retira el distanciador (Figura 18B) y se coloca la tira en la unidad óptica del dispositivo de medida, con la mancha de color de la capa indicadora hacia abajo (Figura 18C). El nivel de amonio aparece en la pantalla en  $\mu\text{mol/L}$  (Figura 18D). El rango de detección de éste método es de 7-286  $\mu\text{mol/L}$ . Los niveles esperados en adultos sanos son entre 11 y 32  $\mu\text{mol/L}$  aunque esto puede variar ligeramente entre distintos laboratorios (237).



**Figura 18.** Test de medición de amonio en sangre.

## 8. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES INMUNITARIAS

La obtención de sangre para el estudio de las alteraciones inmunitarias se realizó el mismo día que los test psicométricos y el análisis de los niveles de amonio. Este estudio incluyó el análisis del inmunofenotipo mediante citometría de flujo, la determinación de citocinas en suero mediante ELISA, el análisis de factores de transcripción mediante PCR cuantitativa (qPCR) y la determinación de niveles de IgG en plasma por *Western Blot*.

### 8.1. Estudio del inmunofenotipo

Para el estudio de las poblaciones leucocitarias se utilizó la citometría de flujo. Con esta técnica, las células aisladas pasan por el interior de una corriente a través de un sensor que detecta una propiedad específica. En este caso se obtuvo una medida indirecta del tipo celular mediante la excitación de fluorocromos incorporados a la célula marcando una proteína concreta.

El análisis se realizó con el citómetro *Gallios flow* (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) y el software *Kaluza Analysis* (Beckman Coulter) (Figura 24).

#### 8.1.1. Estudio cuantitativo de poblaciones leucocitarias

Teniendo en cuenta la autofluorescencia de la propia muestra, en primer lugar, se obtuvo un control negativo. Para ello se pusieron 50  $\mu$ l de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro, se añadieron 2 mL de BD FACS *Lysing Solution* 1x (BD Biosciences) como solución de lisis y se incubó 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se pasó la muestra por el citómetro para considerar solamente la fluorescencia emitida por la excitación del fluoróforo unido a la proteína de estudio.

A continuación se realizó el análisis cuantitativo del inmunofenotipo. A partir de 50  $\mu$ l de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro, se añadieron los anticuerpos específicos para las diferentes poblaciones leucocitarias (Tabla 9).

Se añadieron 2 mL de BD FACS *Lysing Solution* 1x (BD *Biosciences*) y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se añadieron 50 µl de *Flow Count* (Beckman Coulter) para la cuantificación exacta de células por microlitro y se midieron en el citómetro.

**Tabla 9.** Anticuerpos utilizados para la selección de poblaciones de linfocitos T y monocitos.

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Casa comercial
CD45-KO	Krome Orange	J.33	Beckman Coulter
CD3-APC	Allophycocyanin	UCHT1	Biologend
CD4-ECD	Phycoerythrin-Texas Red-X	SFCI12T4D11 (T4)	Beckman Coulter
CD28-PB	Pacific Blue	CD28.2	Biologend
CD69-PE	Phycoerythrin	FN50	Biologend
CD14-PB	Pacific Blue	M5E2	Biologend
CD16-APC-AlexaFluor750	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750	3G8	Beckman Coulter
CD56-PE	Phycoerythrin	B-A19	INMUNOSTEP

Se identificaron las poblaciones de la siguiente manera:

- Leucocitos: células marcadas con CD45.
- Neutrófilos: reconocidos por la morfología dentro de la población CD45+.
- Monocitos: reconocidos por la morfología dentro de la población CD45+ y por ser marcados específicamente con CD14 y CD16.
- Linfocitos: reconocidos por la morfología dentro de la población CD45+. Se subdividen en:
  - Linfocitos B: marcados con CD19.
  - Linfocitos T: marcados con CD3:
    - Linfocitos T CD4: células CD4+ y CD8- dentro de la población de linfocitos T.
    - Linfocitos T CD8: células CD8+ y CD4- dentro de la población de linfocitos T.
  - NK: marcados con CD56.

### 8.1.2. Estudio de monocitos

Partiendo de 50 µl de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro, se añadieron los anticuerpos contra CD45, CD14 y CD16 (Tabla 9).

Se añadieron 2 mL de BD FACS *Lysing Solution* 1x (BD Biosciences) y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se añadieron 50 µl de *Flow Count* (Beckman Coulter) para la cuantificación exacta de células por microlitro y se midió en el citómetro.

Los monocitos fueron identificados por la morfología dentro de la población de las células CD45+ y por la exclusión de linfocitos y neutrófilos gracias al CD14 y CD16 y de las NK con el CD56. Se identificaron tres estadios de monocitos según perdían el CD14 e iban adquiriendo el CD16:

- **Monocitos clásicos:** CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>.
- **Monocitos intermedios:** CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>.
- **Monocitos alternativos:** CD14<sup>-</sup>CD16<sup>++</sup>.

### 8.1.3. Estudio de linfocitos T autorreactivos

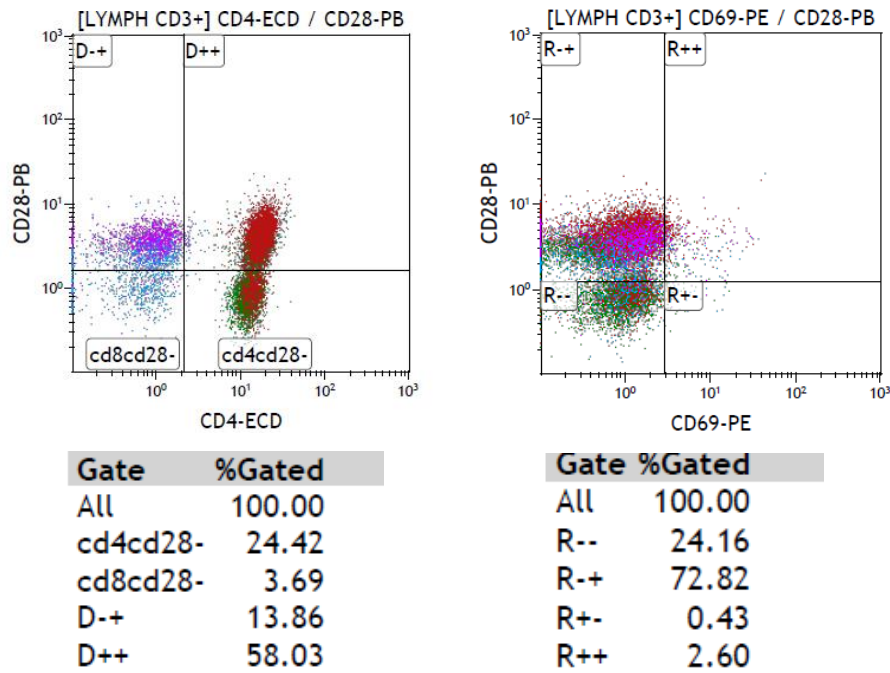
Partiendo de 50 µl de sangre EDTA en 1 tubo de citómetro, se añadieron los anticuerpos contra CD45, CD3, CD4 y CD28 (Tabla 9).

Se procedió de la misma manera y se identificaron dos poblaciones dentro de los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>):

- **Linfocitos CD4 autorreactivos:** linfocitos CD4 carentes de la molécula coestimuladora CD28 (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) (Figura 19).
- **Linfocitos CD4 no autorreactivos:** linfocitos CD4 con molécula coestimuladora CD28 en la membrana celular (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>).

### 8.1.4. Estudio de marcadores de activación

Posteriormente, para el estudio de marcadores de activación de las diferentes poblaciones leucocitarias se partió de la misma muestra añadiendo un anticuerpo contra CD69 (Tabla 9) que indica el grado de activación de las poblaciones reconocidas.



**Figura 19.** Citometría: ejemplo de estrategia de selección para los linfocitos CD4 autorreactivos (CD4+CD28-) y activados (CD69+).

## 8.2. Determinación de citocinas en suero

Todas las citocinas, en su mayoría IL, fueron medidas en suero por el método ELISA con kits comerciales siguiendo el protocolo correspondiente a cada uno de ellos (Tabla 10).

Teniendo en cuenta que cada kit comercial puede tener variaciones, como protocolo general se empleó una placa de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal contra la citocina humana de interés. Se hizo una curva de calibrado acorde al rango de

detección del kit comercial, utilizando el estándar proporcionado y haciendo las diluciones recomendadas. Se añadió el volumen necesario de los estándares y de las muestras a los pocillos y se incubó durante el tiempo requerido. La citocina presente en el suero se unió al anticuerpo, a su vez unido a la placa. Se lavó varias veces con solución de lavado específica del kit comercial y se aspiraron los pocillos para eliminar todo aquello que no estuviera unido. Se añadió el anticuerpo de detección biotinilado y se incubó durante el tiempo especificado por el protocolo formándose un complejo anticuerpo-antígeno. Se volvió a lavar la placa, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa y se incubó de nuevo el tiempo necesario. Se lavaron los pocillos con solución de lavado y se añadió el sustrato *tetramethylbenzidine* que produjo un compuesto con una intensidad de color proporcional a la cantidad de citocina de interés presente en la muestra. Tras la reacción colorimétrica, se añadió la solución de *Stop* (generalmente un ácido) para parar la reacción y se leyó la absorbancia a 450 nm en el lector de placas (*Multiskan Ascent, Thermo*). En algunos casos, en vez del complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa, se utilizaron anticuerpos conjugados que se revelaron con otra sustancia colorimétrica proporcionada por el kit. Los resultados se calcularon extrapolando la absorbancia obtenida en las muestras en la curva patrón de los estándares, indicando así la concentración de citocina presente.

**Tabla 10.** Kits comerciales ELISA.

Citocinas	Kit comercial
<b>IL-6</b>	Human IL-6 Platimun ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS213/2
<b>IL-18</b>	Human IL-18 Platimun ELISA eBioscience ref. BMS267/2CE
<b>IL-15</b>	Human IL-15 Quantikine ELISA Kit R&D systems ref. D1500
<b>IL-17</b>	Human IL-17 High Sensitivity ELISA eBioscience ref. BMS2017HS
<b>IL-21</b>	Human IL-21 Platimun ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS2043
<b>IL-22</b>	Human IL-22 Platinum ELISA Affymetrix eBioscience ref. BMS2047
<b>CXCL13</b>	Human CXCL13/BLC/BCA-1 Quantikine ELISA Kit R&D systems ref. DCX130
<b>CX3CL1</b>	Human CX3CL1/Fractalkine Quantikine ELISA Kit R&D systems ref. DCX310
<b>CCL20</b>	Human CCL20/MIP-3 $\alpha$ Quantikine ELISA R&D systems ref. DM3A00

### 8.3. Análisis de factores de transcripción

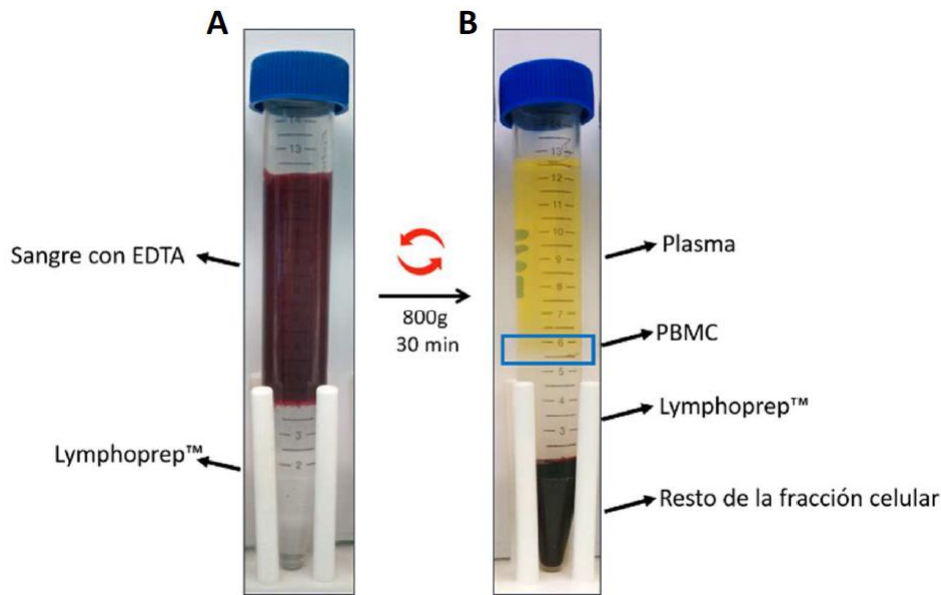
Los linfocitos T CD4 se pueden diferenciar en distintas subpoblaciones caracterizadas por la expresión de factores de transcripción específicos. Para la determinación de las subpoblaciones de linfocitos Th, se analizaron los factores de transcripción BCL6, AHR, TBX21, GATA3 y RORC, característicos de los linfocitos Thf, Th22, Th1, Th2 y Th17, respectivamente, mediante qPCR.

#### 8.3.1. Aislamiento de células mononucleares

En primer lugar, se realizó el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cells*-). Para ello, se mezcló la sangre recogida en tubos con EDTA (25 mL) y con este volumen de partida, se realizó una serie de centrifugaciones y lavados:

1. En primer lugar, se diluyó la sangre en NaCl 0.9% en una proporción 1:1 para después verter con cuidado la sangre sobre el *Lymphoprep*<sup>TM</sup> en tubos de centrífuga de polipropileno, estériles, de 15 mL (*Fisherbrand*<sup>TM</sup>) con 1 volumen de *Lymphoprep*<sup>TM</sup> por cada 2 volúmenes de sangre. Se centrifugó a 800 x g, 30 minutos a 18°C en una centrífuga de rotor basculante y con un programa de centrifugación sin freno. De esta manera, los eritrocitos y el resto de la fracción celular de la sangre quedaron en el fondo del tubo, separados del halo de PBMC por el reactivo y con el plasma en la parte superior (Figura 20).
2. Se recogió la fase blanquecina (el halo de PBMC) junto con el plasma, se pasó a un tubo de centrífuga de 50 mL (*Fisherbrand*<sup>TM</sup>) y se llenó hasta el doble de volumen con RPMI 1640 (*Biowest*) para lavar el exceso de *Lymphoprep*<sup>TM</sup> que pudiese quedar. Se centrifugó a 1000 x g, 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Se resuspendió el *pellet* en 6 mL de RPMI 1640 (*Biowest*) pasándolo a un tubo de centrífuga de 15 mL (*Fisherbrand*<sup>TM</sup>) y se centrifugó a 1000 x g, 10 minutos a temperatura ambiente.





**Figura 20.** Separación de PBMC. A: antes y B: después de la centrifugación.

4. En caso de que el *pellet* obtenido contuviera eritrocitos (visualizado de color rojo), se añadió un paso extra para lisar los eritrocitos, resuspendiendo el *pellet* en 1 mL de *Orthoimmune Lysing Reagent*® (*Ortho Diagnostic Systems*, Raritan, USA) durante 30-60 segundos y centrifugándolo a 250 x g, 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Por último, se resuspendió el *pellet* en 3 mL de RPMI y se separaron 10 µl para contar el número de células. Se realizó una dilución de la muestra con azul de tripán (*Tripan Blue Solution*, 0.4%, Sigma) en proporción 1:1. Se cargaron 10 µl de la dilución en la cámara Neubauer (*Marienfeld-Superior*) y se contó al microscopio el número de células vivas sacando el promedio de células vivas en los 16 cuadrantes de la cámara y multiplicando el valor por el factor de dilución (en nuestro caso el valor es 2) y por la constante 10.000 para la obtención del número de células por mililitro (céls/mL).
6. Se volvió a centrifugar a 1000 x g, 5 minutos a temperatura ambiente, para resuspender el *pellet* en suero bobino fetal inactivado, teniendo en cuenta el volumen necesario para poner una cantidad de 5 millones de células por mililitro en cada criotubo y se añadió el DMSO (10% del volumen final) para criopreservar las células.

7. Se congelaron los criotubos de manera progresiva para mantener en todo momento la máxima integridad de las células. Primero dentro del *Mr. Frosty* (Nalgene™), previamente lleno con isopropanol a -80°C para garantizar la congelación progresiva de -1 grado por minuto. Una vez pasadas al menos 24h, se almacenaron en el congelador de -80°C.

### 8.3.2. Aislamiento del ARN

A continuación, se realizó el aislamiento del ARN total de las PBMC. Para ello, se utilizó 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 consistió en una serie de purificaciones en columna seguidas de una digestión del ADN genómico mediante una enzima desoxirribonucleasa.

Se determinó la concentración y pureza del ARN mediante el uso del *Nanodrop ND-2000 (Nanodrop, LabTech International)*. Se comprobó la pureza del ARN atendiendo al cociente de absorbancia  $\lambda=260 \text{ nm}/\lambda=280 \text{ nm}$ , de manera que valores comprendidos entre 1,8 y 2,0 indicaban un ARN en buen estado.

### 8.3.3. Retro-transcripción del ARN

Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de retro-transcripción mediante una RT-PCR. El ARN total se retro-transcribió a ADN complementario con el kit *High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems)* con la utilización de un termociclador T-100 (*Bio-Rad*).

Las condiciones de PCR fueron: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 37°C (x2) y 5 minutos a 85°C. El volumen final de la reacción fue de 20  $\mu\text{l}$  y la concentración inicial de ARN pudo variar en función de las necesidades manteniendo siempre la misma cantidad de ADN complementario para la PCR cuantitativa.

### 8.3.4. PCR cuantitativa

Finalmente, se realizó la qPCR. Estas reacciones se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos (*Applied Biosystems*). Se cuantificó la expresión de cada gen de interés relativa a la expresión de un control endógeno de expresión constitutiva (en este caso se utilizó la sonda para el gen HPRT). Para ello se emplearon sondas Taqman® (*Applied Biosystems*) conjugadas con el fluoróforo FAM (Tabla 11) y el *Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystems*). La reacción de qPCR se llevó a cabo en un termociclador *ABI Prism 7900 sequence detection system* (*Applied Biosystems*) con el software *StepOne 2.1*. Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 minutos a 95°C y 1 minuto a 60°C. El incremento (*fold change*) de la expresión del gen se calculó en las muestras de los pacientes (sin y con EHM) respecto a los controles mediante el método de  $\Delta\Delta CT$  donde  $\Delta\Delta CT = \Delta CT$  (paciente) –  $\Delta CT$  (control = media de los valores  $\Delta CT$  de todas las muestras control) y donde  $\Delta CT$  es el CT del gen de interés menos el CT del gen constitutivo HPRT para todas las condiciones. El *fold change* indicó si el gen de interés se estaba expresando más o menos en el paciente que en el control, de manera que, si el valor era = 1, la expresión era igual; >1, la expresión era mayor; y <1, la expresión era menor.

**Tabla 11.** 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
TBX21	Hs00203436_m1
GATA3	Hs00231122_m1

#### 8.4. Determinación de niveles de IgG

El aumento en la activación de los linfocitos B puede verse reflejado por un incremento en la concentración de IgG en plasma. Por ello, se cuantificaron los niveles de IgG en plasma mediante la técnica de *Western Blot*.

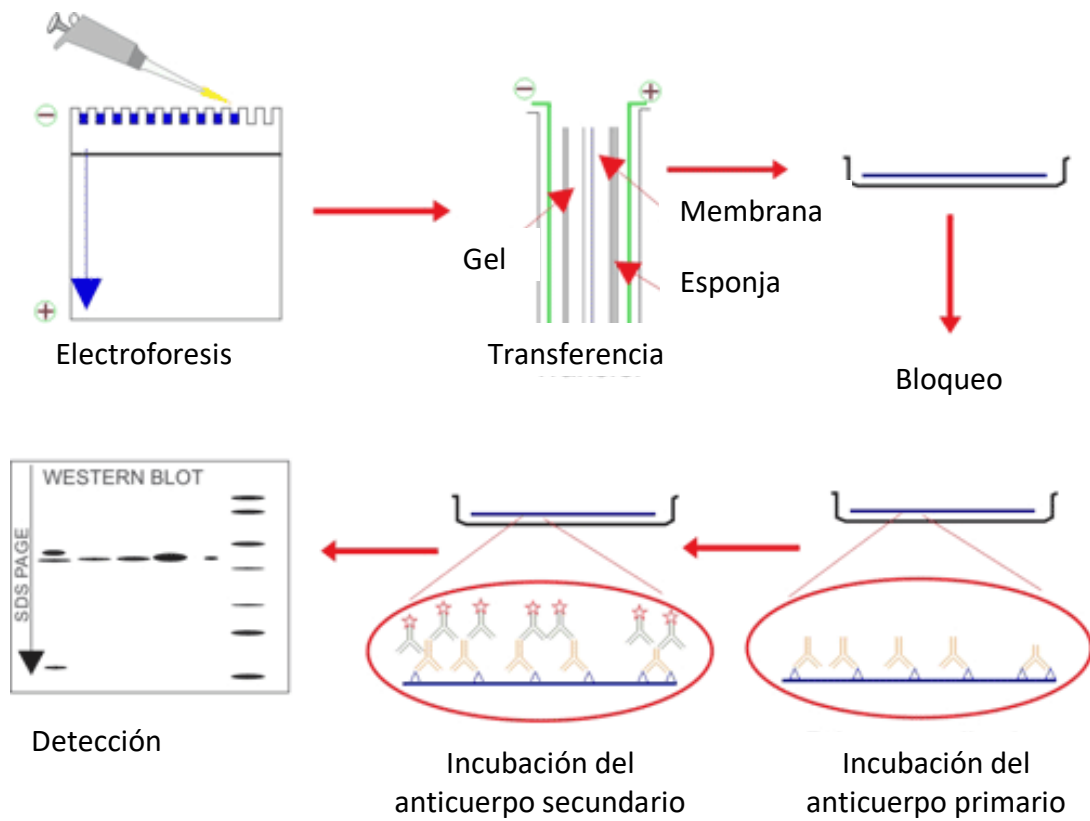
En primer lugar, se cuantificó la concentración de proteína total en plasma mediante el método colorimétrico BCA (*BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific*). Este método consistió en la adición de dos reactivos (reactivo A: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1 M; reactivo B: sulfato cúprico 4%) a la muestra diluida dando lugar a una reacción colorimétrica cuya absorbancia a 570 nm fue registrada por un lector de placas. El valor de dicho registro se interpoló en la curva patrón a partir de los valores obtenidos por concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA -*bovine serum albumin*-).

Tras la cuantificación de las proteínas totales de la muestra, se realizó la técnica de *western blot* para la inmunodetección de los niveles de IgG en plasma (Figura 21). Se calculó el volumen necesario para obtener la misma cantidad de proteínas en cada muestra (30 µg). Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida del 10-12% con SDS (dodecilsulfato sódico, Sigma). Para ello, se cargó la misma cantidad de proteína en cada pocillo (30 µg), disuelta en tampón de carga 2X (Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8, glicerol 5%, SDS 10%, 2-mercaptoetanol 2,5%, azul de bromofenol 1%). Los geles de poliacrilamida constaban 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 concentraba la muestra en una banda estrecha antes del inicio de su separación, y gel “*running*” (Tris base 0,4 M, 0,1% SDS a pH a 8,8, acrilamida 8%, bisacrilamida 0,2%, APS 0,04% y TEMED), en el que las proteínas se separaban según su masa molecular relativa. El tampón empleado para la electroforesis contenía Tris base 0,3%, 0,02% SDS, glicina 1,5% y se aplicaba una intensidad de corriente de 25 mA por gel. Una vez terminada la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (Tris base 0,025 M, glicina 0,05 M) aplicándose una corriente de 400 mA durante 2 horas.

A continuación, se bloquearon 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 se lavaron varias veces con TBS-*Tween*. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Se utilizó el anticuerpo anti-IgG humana monoclonal de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (Clon GG-5, Sigma ref. A2064) a una dilución de 1:80000 (Tabla 12). Se volvió a lavar la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima fosfatasa durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se lavó de nuevo con TBS-*Tween* y se realizó un último lavado con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH 9,5). Para revelar la membrana se utilizó un método colorimétrico para la enzima fosfatasa con una solución de revelado (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 100 mM, 0,6% Nitroblue-tetrazolium, 0,35% 5-Br-4-Cl-3-indolilfosfato, pH 9,5). La reacción colorimétrica dio 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 fue cuantificada con el programa *AlphaImager* 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK). Se utilizó la actina como control de carga para calcular, relativo a este control endógeno, la cantidad de las proteínas de interés encontradas en la muestra. Los datos se expresaron en porcentajes referentes a la población control.

**Tabla 12.** Anticuerpos utilizados para la determinación de niveles de IgG.

Anticuerpo primario	Dilución primaria	Especie	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Dilución secundaria
Anti-human IgG-Alkaline phosphatase	1:80000	Ratón (ms)	Sigma (ref. A2064)	α-ms fosfatasa alcalina (Sigma)	1:4000
B-actina	1:4000	Ratón (ms)	Abcam (ref. ab6276)	α-ms fosfatasa alcalina (Sigma)	1:4000



**Figura 21.** Técnica de *western blot* para la cuantificación de proteínas.

## **9. TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA**

Los pacientes con cirrosis hepática clasificados como con EHM por el PHES (valor  $\leq -4$ ), recibieron tratamiento con rifaximina 400mg/8h vía oral durante un mínimo de 3 meses.

A los 3 meses se repitieron el PHES. Aquellos pacientes que lo mejoraron fueron considerados respondedores totales si el PHES era  $> -4$  y parciales si el PHES era  $> -5$  con una mejoría superior al 50% respecto al valor basal. Aquellos pacientes que no alcanzaron estos valores, se consideraron no respondedores.

Los pacientes respondedores mantuvieron el tratamiento más allá de los 3 meses mientras que los no respondedores lo mantuvieron o retiraron en función de las preferencias del paciente y el médico responsable.

Se registraron los efectos secundarios, los motivos y fecha de retirada del fármaco y se evaluó la adherencia al tratamiento con dos métodos:

- Entrevista directa con el paciente.
- Sistema de prescripción electrónica de farmacia mediante el cálculo del porcentaje de medicación prescrita que fue dispensada en la farmacia, considerándose no adherente a un valor  $< 80\%$  (238).

Además del PHES, los test psicométricos se realizaron antes del inicio del tratamiento, se repitieron a los 3 meses en todos los pacientes y a los 6 y 12 meses en aquellos pacientes que continuaban con el fármaco. El estudio de los niveles de amonio y las alteraciones inmunitarias también se realizaron al inicio del estudio y se repitieron a los 3 meses en todos los pacientes y a los 6 meses en aquellos que mantenían la rifaximina.

## 10. ANÁLISIS DE DATOS

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas estadísticos *GraphPad Prism* 5 y *SPSS V22* (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Se realizó un análisis descriptivo para caracterizar la muestra. La distribución de las variables cuantitativas se obtuvo mediante el análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk y se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) o mediana  $\pm$  rango intercuartílico en función de si tenían o no una distribución normal. Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias absolutas y porcentajes (%).

Se realizó un análisis univariante para estudiar la relación entre variables demográficas, clínicas y analíticas con la condición de EHM. Para las variables cualitativas se utilizó la prueba de  $\chi^2$  o el test de Fisher (variables que mostraron más del 25% de las categorías con un valor esperado inferior a 5) y se utilizó la razón de probabilidad (OR) con el intervalo de confianza del 95% (IC95) como medida de asociación. Para comparar variables cuantitativas se utilizó el test t de *Student*, la prueba U de Mann-Whitney o el análisis ANOVA seguido del post-hoc Tukey. El test de Levene se utilizó para comprobar la igualdad de varianzas.

Para determinar la contribución de cada una de las variables en el desarrollo de EHM, se realizó un análisis multivariante de regresión logística incluyendo aquellas variables significativas y relevantes del análisis univariante.

Se realizó un análisis de correlación bivariada con el coeficiente de correlación de Spearman en el caso de variables discretas o de Pearson en caso de variables continuas.

Para evaluar la capacidad pronóstica de las variables analizadas se utilizaron las curvas *receiver operating characteristic* (ROC) y el área bajo la curva (AUROC) con su IC95. Se utilizó el índice de Youden para identificar el punto de corte con una mayor sensibilidad y especificidad.



Se compararon los resultados antes y después del tratamiento con rifaximina con el test t de *Student* pareado o la prueba de Wilcoxon en caso de variables continuas y con el test de McNemar con variables cualitativas.

Se realizaron análisis de supervivencia con las curvas de Kaplan-Meier y se compararon con el test de log-rank.

Todas las pruebas fueron bilaterales y se consideró significativo, un valor de  $p < 0,05$ .

## **11. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia (anexo 1) y clasificado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (anexo 2).

Se entregó una carta de información con los detalles del estudio así como el consentimiento informado que fue firmado por todos los pacientes y controles voluntariamente antes de su participación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, cualquier paciente o control pudo acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

El tratamiento, comunicación y cesión de los datos de los sujetos se realizó conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal y por su reglamento (RD 1720/2007).

Todos los datos y la información médica relacionada, han sido tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, la publicación de los resultados en revistas científicas, en ningún momento proporciona datos personales de los pacientes o controles que han colaborado en esta investigación.

Durante la participación de los sujetos en este estudio, se extrajo un análisis de sangre. Esta muestra no será almacenada, será siempre utilizada con fines científicos y no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos. Este estudio cumple la normativa vigente de la Ley 14/2007 de investigación biomédica en cuanto a la protección de los derechos de los pacientes que quieran libremente participar y el manejo de muestras biológicas.

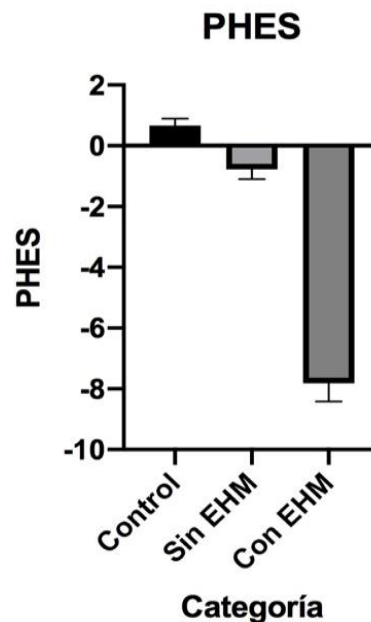
## **VI. RESULTADOS**



## 1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron un total de 63 pacientes con cirrosis hepática y 30 controles voluntarios sanos.

De los pacientes con cirrosis, 32 fueron clasificados como con EHM y 31 sin EHM por el PHES. La media del PHES en los controles fue de  $0,7 \pm 0,2$ ; mientras que la de los pacientes fue de  $-4,4 \pm 0,6$ , con una media de  $-0,8 \pm 0,3$  y  $-7,8 \pm 0,6$  en los pacientes sin y con EHM, respectivamente (Figura 22).



**Figura 22.** Valores (media  $\pm$  EEM) del PHES en los grupos del estudio.

La media de edad de los pacientes con cirrosis fue de  $61 \pm 1,1$  años; mientras que la de los controles fue de  $59 \pm 1,2$  años, sin diferencias significativas entre los grupos ( $p=0,253$ ). Se incluyeron un total de 11 (18%) mujeres en el grupo de pacientes y de 17 (57%) en el grupo de controles ( $p<0,001$ ).

## 2. EVALUACION DE FACTORES CLÍNICOS Y ANALÍTICOS

Se analizaron los factores clínicos en los distintos grupos del estudio y se compararon en función de la presencia de cirrosis hepática y EHM (Tabla 13).

No se observaron diferencias significativas en cuanto a edad al inicio del estudio, sexo, factores de riesgo cardiovascular, comorbilidades o edad al diagnóstico de la cirrosis entre los pacientes con y sin EHM.

En cuanto a la etiología de la cirrosis, no se observaron diferencias en la proporción de pacientes con cirrosis enólica entre los grupos con y sin EHM (OR=1,1; IC95=0,4-2,9; p=0,904), mientras que la cirrosis por el VHC fue más frecuente en el grupo de pacientes sin EHM (OR=0,3; IC95=0,1-0,8; p=0,021). Aunque en forma de tendencia, el tratamiento etiológico de la cirrosis se asoció con un menor riesgo de EHM (OR=0,1; IC95=0,01-1,1; p=0,070).

Entre los otros tratamientos analizados, se observó una mayor proporción de pacientes con tratamiento diurético (furosemida y/o espironolactona) en el grupo de EHM (OR=4,5; IC95=1,5-13,6; p=0,006). Al analizar cada uno de los diuréticos por separado, se mantuvo la relación tanto con la toma de furosemida (37% vs 13% en los grupos con y sin EHM, respectivamente; OR=3,9; IC95=1,1-14,1; p=0,031) como de espironolactona (47% vs 19% con y sin EHM, respectivamente; OR=3,7; IC95=1,2-11,4; p=0,023). No se encontraron diferencias entre ambas categorías de EHM en la utilización de otros tratamientos como benzodiazepinas (OR=0,8; IC95=0,2-3,1; p=0,785), norfloxacino (OR=4,6; IC95=0,5-43,9; p=0,195) o lactulosa (OR=1,0; IC95=0,2-4,4; p=1,000).

No se encontraron diferencias significativas en el grado de función hepática entre los grupos con y sin EHM. No obstante, los pacientes con EHM presentaron una mayor proporción de cirrosis descompensada (OR=5,3; IC95=1,8-15,8; p=0,002); fundamentalmente en forma de ascitis (OR=4,2; IC95=1,4-12,3; p=0,007).

Tabla 13. Factores clínicos en los distintos grupos del estudio.

Variable	Controles (n=30)	Pacientes (n=63)		p-valor (con vs sin EHM)
		Sin EHM (n=31)	Con EHM (n=32)	
<b>Edad (años), media (EEM)</b>	59 (1,2)	61 (1,3)	62 (1,7)	0,499
<b>Sexo M/F, n (%)</b>	13 (43)/17 (57)	25 (81)/6 (19)**	27 (84)/5 (16)**	0,697
<b>FRCV, n (%)</b>				
- Síndrome metabólico		4 (13)	7 (23)	0,289
- HTA		10 (32)	10 (33)	0,929
- DM		10 (32)	16 (52)	0,123
- DL		10 (32)	8 (27)	0,632
<b>Comorbilidades, n (%)</b>				
- Cardiopatía		3 (8)	2 (7)	1,000
- Enfermedad pulmonar		5 (16)	5 (19)	1,000
- Enfermedad renal		0 (0)	2 (7)	---
<b>Edad al diagnóstico de la cirrosis, media (EEM)</b>		56 (2,3)	50 (4,8)	0,327
<b>Etiología de la cirrosis, n (%)</b>				
- Alcohol		16 (52)	17 (53)	0,904
- VHC		13 (42)	5 (16)	<b>0,021</b>
- EHGNA		1 (3)	5 (16)	0,196
- Otras^		1 (3)	5 (16)	0,196
<b>Tratamiento etiológico, n (%)</b>		28 (97)	16 (76)	0,070
<b>Otros tratamientos, n (%)</b>				
- IBP		13 (42)	13 (42)	1,000
- Metformina		5 (16)	9 (30)	0,198
- Benzodiazepinas		6 (19)	5 (17)	0,785
- BBNC		9 (29)	7 (23)	0,613
- Furosemina		4 (13)	11 (37)	<b>0,031</b>
- Espironolactona		6 (19)	14 (47)	<b>0,023</b>
- Norfloxacino		1 (3)	4 (13)	0,195
- Lactulosa		4 (13)	4 (13)	1,000
<b>Hipertensión portal, n (%)</b>		27 (96)	25 (86)	0,173
<b>Child-Pugh, n (%)</b>				0,502
- A		23 (74)	19 (59)	0,490
- B		7 (23)	11 (34)	0,300
- C		1 (3)	2 (6)	0,573
<b>MELD, media (EEM)</b>		9 (0,5)	10 (0,7)	0,509
<b>Descompensaciones, n (%)</b>		9 (29)	22 (69)	<b>0,002</b>
- Hemorragia variceal		1 (3)	7 (22)	0,053
- Ascitis		8 (26)	19 (59)	<b>0,007</b>
- PBE		0 (0)	5 (17)	<b>0,024</b>
- SHR		1 (3)	2 (7)	0,612
- ACLF		1 (3)	4 (13)	0,195
<b>Trombosis portal, n (%)</b>		3 (10)	3 (10)	1,000

^VHB, colangitis biliar primaria, autoinmune, hemocromatosis o cirrosis criptogénica.

\*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

**Abreviaturas:** EEM: error estándar de la media; M/F: masculino/femenino; FRCV: factores de riesgo cardiovascular; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; DL: dislipemia; VHC: virus de la hepatitis C; EHGNA: enfermedad hepática grasa no alcohólica; IBP: inhibidores de la bomba de protones; BBNC: beta-bloqueantes no cardioselectivos; PBE: peritonitis bacteriana espontánea; SHR: síndrome hepatorenal; ACLF: fallo hepático agudo sobre crónico

Así mismo, se analizaron las variables analíticas en los distintos grupos del estudio y se compararon en función de la presencia de cirrosis hepática y EHM (Tabla 14).

**Tabla 14.** Valores analíticos en los distintos grupos del estudio.

Variable	Controles (n=30)	Pacientes (n=63)		p-valor (con vs sin EHM)
		Sin EHM (n=31)	Con EHM (n=32)	
<b>Glucemia (mg/dL)</b>	109 (5)	120 (10)	120 (9)	0,499
<b>Parámetros nutricionales</b>				
- Colesterol (mg/dL)	223 (11)	170 (13)**	183 (8)**	0,376
- Triglicéridos (mg/dL)	119 (12)	143 (31)	98 (8)	0,171
- Proteínas (g/dL)	7,2 (0,1)	7,3 (0,2)	7,4 (0,1)	0,284
<b>Función renal</b>				
- Urea (mg/dL)	38 (3)	37 (4)	35 (2)	0,663
- Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,05)	0,8 (0,05)	0,8 (0,04)	0,724
- Sodio (mEq/L)	138 (0,3)	139 (0,8)	138 (0,8)	0,384
<b>Enzimas hepáticas</b>				
- AST (U/L)	25 (1)	50 (6)***	40 (4)***	0,161
- ALT (U/L)	24 (2)	34 (3)**	31 (2)*	0,550
- GGT (U/L)	32 (7)	109 (20)**	80 (10)***	0,101
- FA (mU/mL)	76 (9)	125 (12)**	132 (11)***	0,709
<b>Función hepática</b>				
- Bilirrubina (mg/dL)	0,6 (0,02)	1,3 (0,2)**	1,7 (0,4)**	0,329
- Albúmina (g/dL)	4,6 (0,07)	3,8 (0,1)***	3,7 (0,1)***	0,777
- INR	1,0 (0,0)	1,2 (0,1)**	1,2 (0,0)***	0,828
<b>Hemograma</b>				
- Leucocitos ( $\times 10^9/L$ )	6,80 (0,7)	5,69 (0,4)	5,35 (0,4)	0,566
- Hemoglobina (g/dL)	14,6 (0,2)	13,4 (0,4)*	13,4 (0,3)**	0,976
- Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	241 (15)	116 (11)***	119 (11)***	0,843

Valores expresados como media (error estándar de la media).

\*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

**Abreviaturas:** AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transferasa; FA: fosfatasa alcalina; INR: ratio internacional normalizado.

Comparado con controles sin enfermedad hepática, los pacientes con cirrosis presentaron niveles superiores de enzimas de citolisis: AST (diferencia de las medias de 19,7; IC95=12,7-26,8;  $p < 0,001$ ) y ALT (diferencia de las medias de 8,5; IC95=3,3-13,9;  $p = 0,002$ ); colestasis: GGT (diferencia de las medias de 61,2; IC95=36,8-85,7;  $p < 0,001$ ) y FA (diferencia de las medias 52,5; IC95=27,7-77,4;  $p < 0,001$ ); y alteración en las pruebas de función hepática: niveles superiores de bilirrubina (diferencia de las medias de 0,7; IC95=1,1-0,3;  $p = 0,001$ ) e INR (diferencia de las medias de 0,2; IC95=0,1-0,3;  $p < 0,001$ ) e inferiores de albúmina (diferencia de las medias de -0,8; IC95=-1,02- -0,6;  $p < 0,001$ ).



El grupo de pacientes con cirrosis presentó niveles inferiores de plaquetas (diferencia de las medias de -124; IC95=-158,9- -89,8;  $p<0,001$ ) y hemoglobina (diferencia de las medias de -1,16; IC95=-1,9- -0,5;  $p=0,001$ ) respecto a los controles. También se observaron valores séricos de colesterol menores en pacientes con cirrosis que en controles (diferencia de las medias de -45,9; IC95=-75,8- -15,9;  $p=0,003$ ).

No se observaron diferencias significativas entre pacientes con y sin EHM en ninguno de los parámetros analíticos.

Se realizó un análisis de correlación entre el PHES y las pruebas de función hepática que resultó no significativo. Sí que se encontró una correlación positiva entre el PHES y los niveles de sodio, albúmina y plaquetas (Tabla 15).

**Tabla 15.** Análisis de correlación entre el PHES y las variables clínicas y analíticas.

Variable	r	p-valor
<b>Child-Pugh</b>	-0,180	0,162
<b>MELD</b>	-0,088	0,501
<b>Glucemia (mg/dL)</b>	-0,180	0,148
<b>Parámetros nutricionales</b>		
- Colesterol (mg/dL)	0,132	0,302
- Triglicéridos (mg/dL)	0,167	0,190
- Proteínas (g/dL)	-0,255	0,058
<b>Función renal</b>		
- Urea (mg/dL)	0,048	0,705
- Creatinina (mg/dL)	-0,010	0,936
- Sodio (mEq/L)	0,352	<b>0,038</b>
<b>Enzimas hepáticas</b>		
- AST (U/L)	-0,142	0,248
- ALT (U/L)	-0,169	0,162
- GGT (U/L)	-0,047	0,701
- FA (mU/mL)	-0,287	<b>0,020</b>
<b>Función hepática</b>		
- Bilirrubina (mg/dL)	-0,228	0,061
- Albúmina (g/dL)	0,341	<b>0,005</b>
- INR	-0,063	0,606
<b>Hemograma</b>		
- Leucocitos ( $\times 10^9/L$ )	0,130	0,295
- Hemoglobina (g/dL)	0,150	0,215
- Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	0,273	<b>0,023</b>

**Abreviaturas:** r: coeficiente de correlación (Pearson); AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transferasa; FA: fosfatasa alcalina; INR: ratio internacional normalizado.

### 3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES NEUROLÓGICAS

#### 3.1. Funciones cognitivas

Se realizaron los test psicométricos centrados en funciones cognitivas específicas, tanto a pacientes como controles, y se compararon en función de la presencia de cirrosis y EHM (Tabla 16).

**Tabla 16.** Resultados de los test cognitivos en los distintos grupos del estudio.

Test psicométrico	Controles (n=30)	Pacientes (n=63)		p-valor (con EHM vs sin EHM)
		Sin EHM (n=31)	Con EHM (n=32)	
<b>Test de Stroop</b>				
- Tarea congruente <sup>a</sup>	115 (2,6)	105 (3,2)*	71 (4)***	<0.001
- Tarea neutra <sup>b</sup>	83 (2,4)	75 (2,3)*	56 (3)***	<0.001
- Tarea incongruente <sup>c</sup>	46 (1,5)	41 (1,7)*	29 (2)***	<0.001
- Interferencia <sup>d</sup>	-1,6 (1)	-2,9 (1,6)	-2,2 (2)	0,788
<b>Test d2</b>				
- TR	402 (16)	337 (13)**	244 (17)***	<0.001
- TA	150 (6,4)	130 (5,5)*	83 (7,3)***	<0.001
- O	17 (2,6)	12 (1,7)	21 (4,4)	0,065
- C	1 (0,2)	4 (1)*	11 (3)**	0,027
- TOT <sup>d</sup>	371 (19)	298 (16)**	214 (16)***	0,001
- CON <sup>d</sup>	146 (6,7)	126 (5,9)*	72 (8,7)***	<0.001
<b>Test de claves oral</b>	50 (1,3)	44 (2)**	23 (2)***	<0.001
<b>Test de dígitos oral</b>	16 (0,8)	13 (0,5)**	10 (0,5)***	0,002
<b>Test de letras y números oral</b>	10 (0,4)	8 (0,5)**	5 (0,5)***	<0.001

Los valores se expresan como media (EEM).

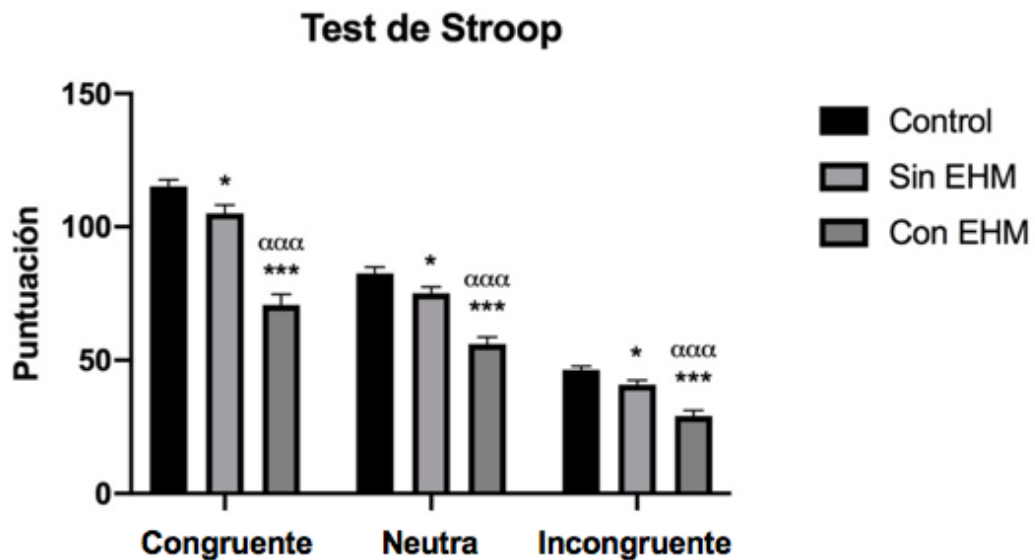
<sup>a</sup>número de palabras, <sup>b</sup>número de colores, <sup>c</sup>número de ítems, <sup>d</sup>valor calculado.

\*Significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

**Abreviaturas:** TR: total de respuestas; TA: total de aciertos; O: omisiones; C: comisiones; TOT: efectividad total en la prueba; CON: índice de concentración.

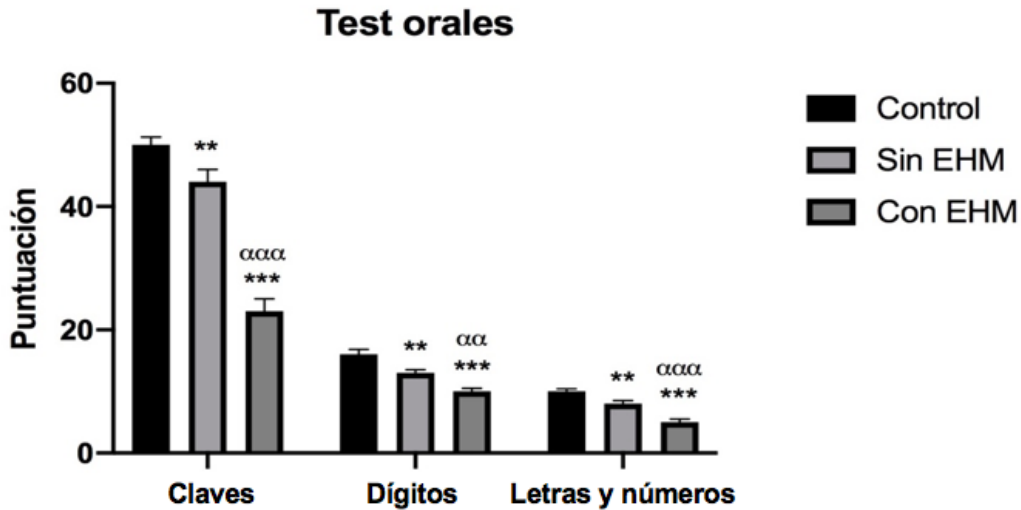
Para evaluar la velocidad del procesamiento mental y la atención selectiva se utilizaron los test de Stroop y de claves oral. Los pacientes con EHM mostraron una velocidad y flexibilidad cognitiva reducidas respecto a los pacientes sin EHM en el test de Stroop con una diferencia de la media de aciertos en 45 segundos de: 35 para el número de palabras (IC95=24-45, p<0,001); 19 para el número de colores (IC95=12-26, p<0,001); y 12 para la tarea incongruente (IC95=6-17, p<0,001). Los pacientes con

cirrosis hepática sin EHM también presentaron una velocidad del procesamiento deficiente respecto a los controles pero menos agravada que en el caso de los pacientes con EHM, con una diferencia de la media de aciertos en 45 segundos de: 10 para el número de palabras (IC95=2-18,  $p=0,019$ ); 8 para el número de colores (IC95=1-14,  $p<0,030$ ); y 6 para la tarea incongruente (IC95=1-10,  $p=0,016$ ) (Figura 23). La media de aciertos para el test de claves oral en el grupo de pacientes con EHM fue significativamente inferior al de pacientes sin EHM (diferencia de las medias de -21; IC95=15-26;  $p<0,001$ ) y controles (diferencia de las medias -28; IC95=23-33;  $p<0,001$ ) (Figura 24).



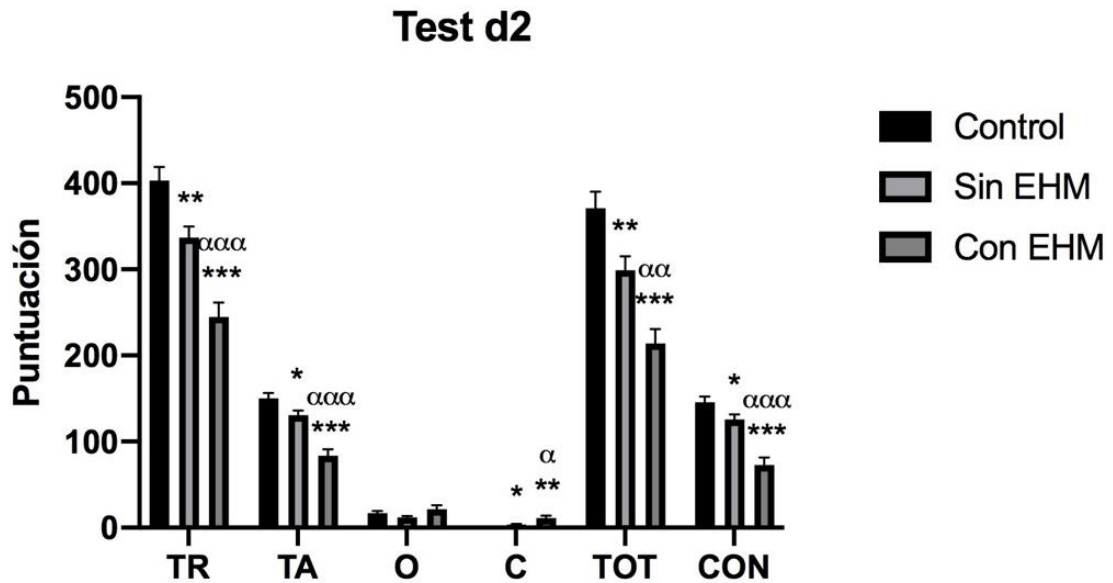
**Figura 23.** Número de ítems completados (media  $\pm$  EEM) del test de Stroop en los grupos del estudio.

\*significación estadística vs control (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p<0,05$ ;  $\alpha\alpha p<0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p<0,001$ ).



**Figura 24.** Puntuación (media ± EEM) de los test orales en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); αsignificación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).

Para evaluar la atención sostenida se utilizó el test d2. Los pacientes con EHM mostraron un déficit en la capacidad de concentración superior a pacientes sin EHM con un menor número de respuestas totales (diferencia de las medias de 93; IC95=50-135;  $p < 0,001$ ) y de aciertos (diferencia de las medias de 47; IC95=29-65;  $p < 0,001$ ) y un mayor número de errores por comisión (diferencia de las medias de 7; IC95=1-14;  $p = 0,027$ ), con una efectividad total de la prueba e índice de concentración reducidos (diferencia de las medias de 84, IC95=38-132,  $p = 0,001$  y 54, IC95=32-75,  $p < 0,001$ ; respectivamente). Los pacientes sin EHM también mostraron una menor capacidad de atención sostenida que los controles pero menos marcada que en el grupo con EHM (Figura 25).



**Figura 25.** Puntuación (media  $\pm$  EEM) del test d2 en los grupos del estudio.

\*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).

**Abreviaturas:** TR: total de respuestas; TA: total de aciertos; O: omisiones; C: comisiones; TOT: efectividad total de la prueba; CON: índice de concentración.

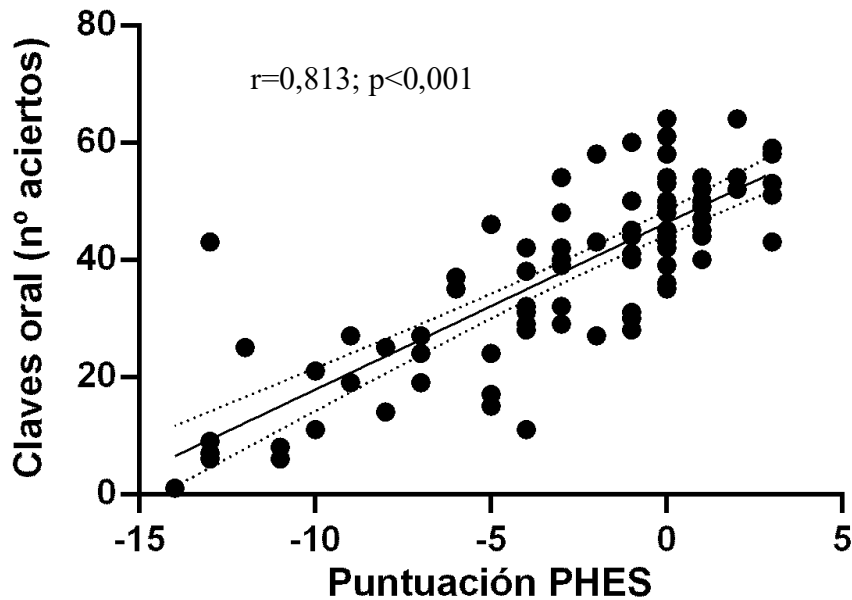
Se evaluó la memoria de trabajo con los test de dígitos y letras y números oral. Se observó que los pacientes con EHM tenían un menor número de aciertos que los pacientes sin EHM y éstos, a su vez, que los controles (Figura 24), de modo que, los pacientes con EHM presentaron la mitad de aciertos que los controles en el test de letras y números oral con una media de  $10 \pm 0,36$  y  $5 \pm 0,54$ , respectivamente (diferencia de las medias de 5; IC95=3-6;  $p < 0,001$ ).

Se realizó un análisis de correlación entre el valor del PHES y el resultado de cada uno de los test psicométricos (Tabla 17) observándose la mejor correlación con el test de claves oral (Figura 26) seguido de una correlación positiva alta con la tarea congruente del test de Stroop (Figura 27).

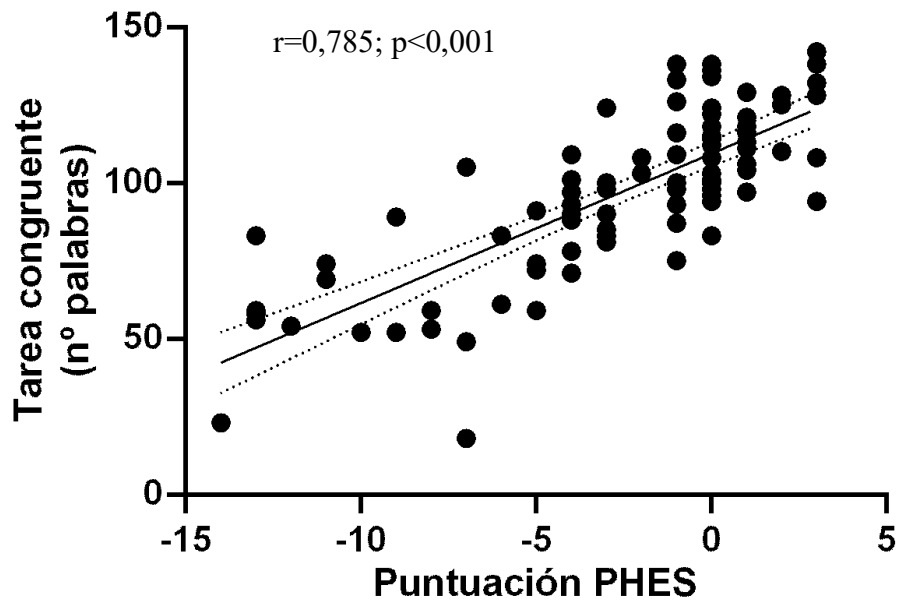
**Tabla 17.** Análisis de correlación entre el PHES y los test psicométricos.

Test	r	IC95	p-valor
<b>Test de Stroop</b>			
- Tarea congruente	0,785	0,691-0,853	<0,001
- Tarea neutra	0,720	0,604-0,738	<0,001
- Tarea incongruente	0,628	0,485-0,734	<0,001
- Interferencia	-0,054	-0,257-0,154	0,613
<b>Test d2</b>			
- TR	0,669	0,531-0,773	<0,001
- TA	0,663	0,524-0,769	<0,001
- O	-0,053	-0,265-0,163	0,630
- C	-0,439	-0,598- -0,249	<0,001
- TOT	0,611	0,456-0,730	<0,001
- CON	0,671	0,544-0,774	<0,001
<b>Test de claves oral</b>	0,813	0,729-0,872	<0,001
<b>Test de dígitos oral</b>	0,502	0,332-0,641	<0,001
<b>Test de letras y números oral</b>	0,627	0,480-0,739	<0,001

**Abreviaturas:** r: coeficiente de correlación (Pearson); IC95: intervalo de confianza del 95%; TR: total de respuestas; TA: total de aciertos; O: omisiones; C: comisiones; TOT: efectividad total en la prueba; CON: índice de concentración.



**Figura 26.** Correlación lineal entre el PHES y el test de claves oral.



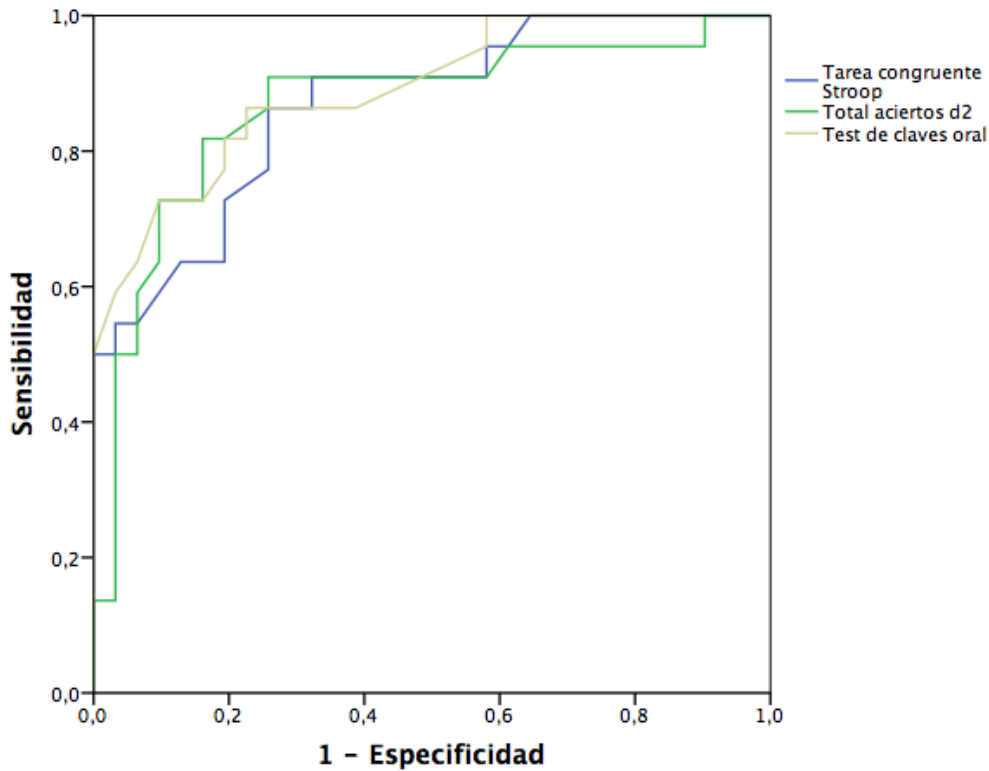
**Figura 27.** Correlación lineal entre el PHEs y la tarea congruente del test de Stroop.

Se realizaron curvas ROC y se calculó el AUROC con su IC95 para evaluar la capacidad diagnóstica de cada uno de los test (Tabla 18). Los test que mostraron un mejor rendimiento para el diagnóstico de la EHM fueron el test de claves oral seguido de la tarea congruente del test de Stroop y del total de aciertos en el test d2 (Figura 28).

**Tabla 18.** AUROC de cada uno de los test psicométricos para el diagnóstico de EHM.

Test	AUROC	IC95	p-valor
<b>Test de Stroop</b>			
- Tarea congruente	0,888	0,809-0,968	<0,001
- Tarea neutra	0,864	0,781-0,966	<0,001
- Tarea incongruente	0,828	0,722-0,934	<0,001
<b>Test d2</b>			
- TR	0,809	0,685-0,932	<0,001
- TA	0,870	0,764-0,975	<0,001
- TOT	0,771	0,641-0,901	0,001
- CON	0,856	0,746-0,965	<0,001
<b>Test de claves oral</b>	0,911	0,842-0,980	<0,001
<b>Test de dígitos oral</b>	0,728	0,602-0,85	0,002
<b>Test de letras y números oral</b>	0,778	0,657-0,899	<0,001

**Abreviaturas:** AUROC: área bajo la curva ROC; IC95: intervalo de confianza del 95%; TR: total de respuestas; TA: total de aciertos; TOT: efectividad total en la prueba; CON: índice de concentración.



**Figura 28.** Curva ROC de la tarea congruente en el test de Stroop, el total de aciertos en el test d2 y el test de claves oral para el diagnóstico de EHM.

Los puntos de corte por debajo de los cuales mejor se discriminaron pacientes con EHM fueron: 39 aciertos en el test de claves oral (sensibilidad del 90% y especificidad del 77%); 96 aciertos en la tarea congruente del test de Stroop (sensibilidad del 87% y especificidad del 74%); y, 108 aciertos en total en el test d2 (sensibilidad del 83% y especificidad del 84%).

Se analizaron factores clínicos y analíticos que pudieran interferir en el resultado de los test psicométricos. Entre los pacientes con cirrosis hepática se observó que la edad tenía una correlación negativa con la ejecución del test de claves oral ( $r=-0,315$ ;  $p=0,013$ ) y d2 ( $r=-0,320$ ;  $p=0,018$ ). El grupo de pacientes con cirrosis por el VHC obtuvo un mayor número de aciertos en la tarea congruente del test de Stroop ( $106 \pm 4$  vs  $81 \pm 4$ ; diferencia de las medias de 26;  $IC95=12-39$ ;  $p<0,001$ ) y en el test de claves oral ( $42 \pm 3$  vs  $31 \pm 2$ ; diferencia de las medias de 11;  $IC95=3-19$ ;  $p=0,008$ ). El tratamiento etiológico de la cirrosis también se asoció con un mayor número de respuestas en la tarea congruente del test de Stroop ( $94 \pm 4$  vs  $69 \pm 5$ ; diferencia de las medias de 25;  $IC95=3-48$ ;  $p=0,028$ ).



Contrariamente, los pacientes con EHGNA tenían un número de aciertos totales menor en el test d2 ( $76 \pm 25$  vs  $114 \pm 5$ ; diferencia de las medias de 38; IC95=1-74;  $p=0,042$ ) y en el de claves oral ( $21 \pm 5$  vs  $35 \pm 2$ ; diferencia de las medias de 14; IC95=2-27;  $p=0,024$ ). La DM y el tratamiento con metformina mostraron una tendencia a una peor ejecución en el test d2 ( $97 \pm 10$  vs  $120 \pm 6$ ; diferencia de las medias de 23; IC95=-0,02-46;  $p=0,050$  y  $89 \pm 15$  vs  $119 \pm 5$ ; diferencia de las medias de 30; IC95=-4-63;  $p=0,078$ ). El tratamiento diurético (furosemida y/o espironolactona) se asoció a una peor ejecución en el test de Stroop ( $79 \pm 4$  vs  $96$ ; diferencia de las medias de 17; IC95=3-30;  $p=0,016$ ), el test d2 ( $95 \pm 9$  vs  $120 \pm 6$ ; diferencia de las medias de 25; IC95=3-47;  $p=0,029$ ) y el test de claves oral ( $27 \pm 4$  vs  $37 \pm 2$ ; diferencia de las medias de 10; IC95=0,8-19;  $p=0,0,33$ ). La cirrosis descompensada también mostró una relación con un menor número de aciertos en la tarea congruente del test de Stroop ( $75 \pm 4$  vs  $99 \pm 4$ ; diferencia de las medias de 24; IC95=12-36;  $p<0,001$ ), fundamentalmente en forma de ascitis ( $74 \pm 5$  vs  $99 \pm 4$ ; diferencia de las medias de 24; IC95=11-36;  $p<0,001$ ) y PBE ( $62 \pm 11$  vs  $92 \pm 3$ ; diferencia de las medias de 29; IC95=6-53;  $p=0,015$ ).

### **3.2. Funciones motoras**

Se realizaron los test de coordinación motora en pacientes y controles y se compararon en función de la presencia de cirrosis y EHM (Tabla 19).

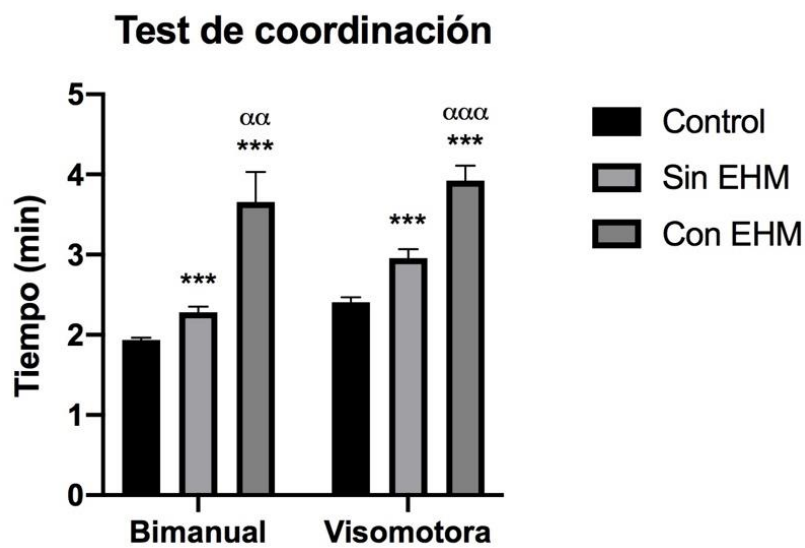
En ambos test, los pacientes con EHM necesitaron un tiempo significativamente superior que los pacientes sin EHM (diferencia de las medias de 1,4 minutos, IC95=0,6-2,2,  $p=0,001$  para el test de coordinación bimanual; y 1 minuto, IC95=0,5-1,4,  $p<0,001$  para el test de coordinación visomotora) y que los controles (diferencia de las medias de 1,7 minutos, IC95=0,9-2,5,  $p<0,001$  para el test de coordinación bimanual; y 1,5 minutos, IC95=1,1-1,9,  $p<0,001$  para el test de coordinación visomotora) para completar la tarea (Figura 29).

Posteriormente se realizó un análisis de correlación que mostró una correlación negativa alta entre el PHES y ambos test de coordinación (Tabla 20).

**Tabla 19.** Resultados de los test de coordinación motora en los grupos del estudio.

Test psicométrico	Controles (n=30)	Pacientes (n=63)		p-valor (con EHM vs sin EHM)
		Sin EHM (n=31)	Con EHM (n=32)	
Test de coordinación bimanual	1,9 (0,03)	2,3 (0,1)***	3,7 (0,4)***	<b>0,001</b>
Test de coordinación visomotora	2,4 (0,1)	3 (0,1)***	3,9 (0,2)***	<b>&lt;0.001</b>

\*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).



**Figura 29.** Tiempo (media ± EEM) en minutos de los test de coordinación en los grupos del estudio.

\*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001); αsignificación estadística vs sin EHM (αp<0,05; ααp<0,01; αααp<0,001).

**Tabla 20.** Análisis de correlación entre el PHES y los test de coordinación.

Test	r	IC95	p-valor
Test de coordinación bimanual	-0,724	-0,810- -0,610	<0,001
Test de coordinación visomotora	-0,784	-0,853- -0,687	<0,001

Abreviaturas: r: coeficiente de correlación (Pearson); IC95: intervalo de confianza del 95%

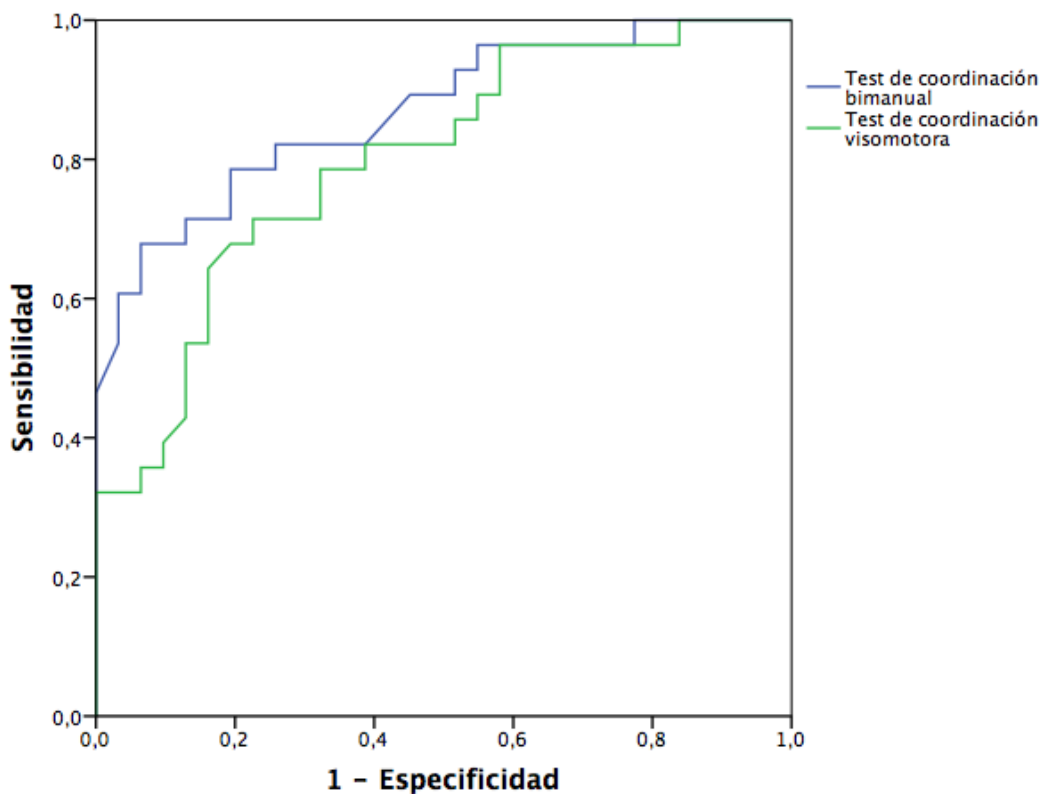
Se realizaron curvas ROC y se calculó el AUROC con su IC95 observándose una mejor precisión para el diagnóstico de EHM con el test de coordinación bimanual (Tabla 21; Figura 30).

**Tabla 21.** AUROC de los test de coordinación motora para el diagnóstico de EHM.

Test	AUROC	IC95	p-valor
Test de coordinación bimanual	0,869	0,778-0,960	<0,001
Test de coordinación visomotora	0,798	0,686-0,911	<0,001

Abreviaturas: AUROC: área bajo la curva ROC; IC95: intervalo de confianza del 95%.

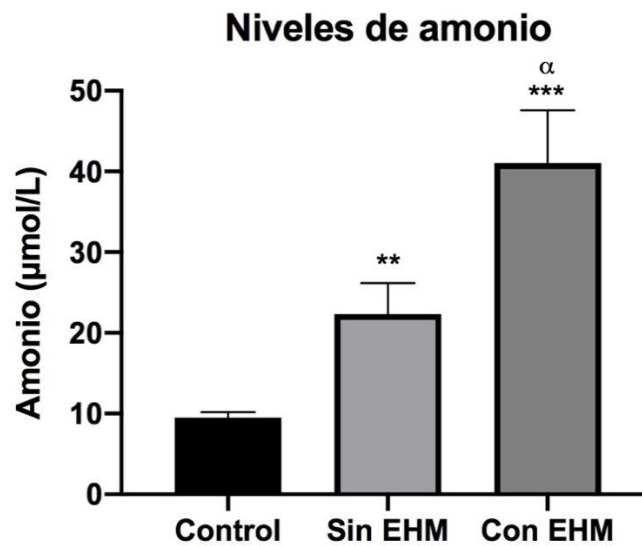
Los puntos de corte por encima de los cuales mejor se discriminó pacientes con EHM fueron: 2,6 minutos en el test de coordinación bimanual (sensibilidad del 79% y especificidad del 81%); y, 3,2 minutos en el test de coordinación visomotora (sensibilidad del 71% y especificidad del 77%).



**Figura 30.** Curva ROC de los test motores para el diagnóstico de EHM.

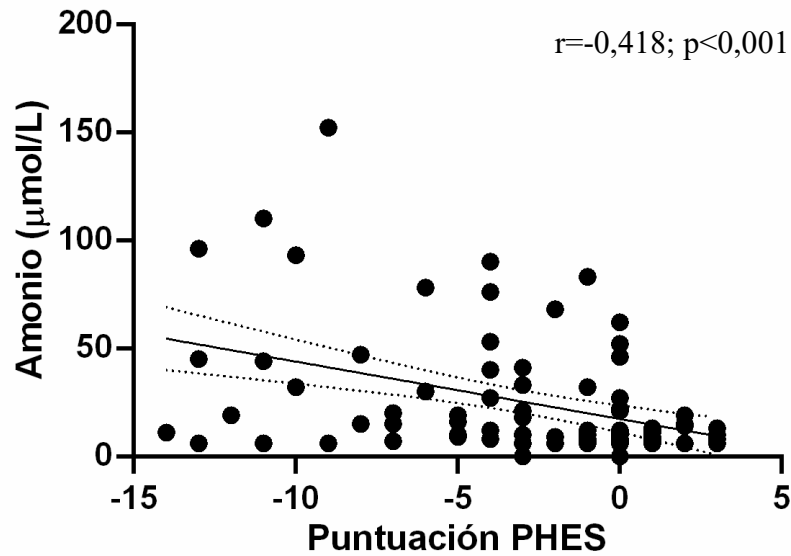
## 4. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE AMONIO EN SANGRE

Se calcularon los niveles de amonio en sangre periférica. La media en el grupo de controles fue de  $9,5 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$ , mientras que la media en el grupo de pacientes fue de  $33 \pm 4 \mu\text{mol/L}$  ( $p < 0,001$ ). Comparado con los controles, se observaron diferencias tanto en el grupo de pacientes sin EHM con una media de  $23 \pm 4 \mu\text{mol/L}$  (diferencia de las medias de  $14 \pm 4 \mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0,001$ ) como con EHM con una media de  $41 \pm 7 \mu\text{mol/L}$  (diferencia de las medias de  $32 \pm 7 \mu\text{mol/L}$ ;  $p < 0,001$ ); manteniéndose estas diferencias significativas al comparar ambos grupos de pacientes con cirrosis (diferencia de las medias de  $18 \pm 8 \mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0,029$ ) (Figura 31).



**Figura 31.** Nivel de amonio (media  $\pm$  EEM) en los tres grupos del estudio.  
\*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).

Se realizó un análisis de correlación entre los niveles de amonio y el PHES que mostró una correlación negativa moderada ( $r = -0,418$ ;  $IC_{95} = -0,573 - -0,234$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 32).



**Figura 32.** Correlación lineal entre el PHES y el nivel de amonio en sangre.

Posteriormente, se evaluó la correlación entre el amonio y los test psicométricos que mostraron un mejor rendimiento diagnóstico, observándose una correlación moderada-baja (Tabla 22).

**Tabla 22.** Análisis de correlación entre los test psicométricos y los niveles de amonio en sangre.

	Test de claves oral		Tarea congruente del test de Stroop		Total de aciertos del d2	
	r	p-valor	r	p-valor	r	p-valor
<b>Amonio</b>	-0,397	<0,001	-0,419	<0,001	-0,375	<b>0,001</b>

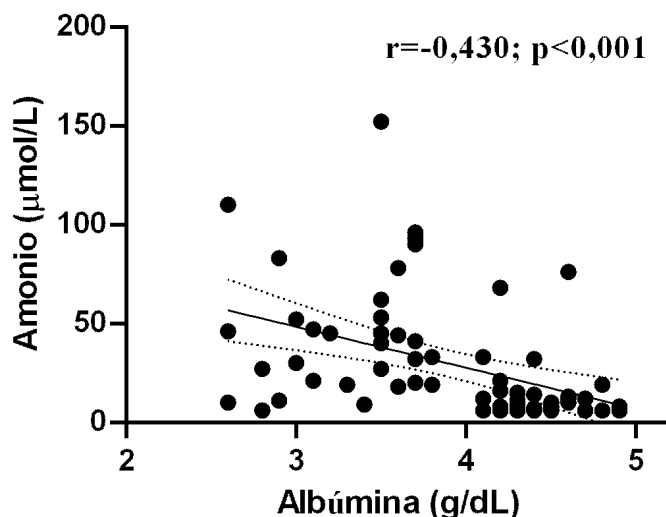
**Abreviaturas:** r: coeficiente de correlación (Pearson).

Los niveles de amonio mostraron un AUROC para el diagnóstico de EHM de 0,662 (IC=0,582-0,795; p=0,027).

Se analizaron factores clínicos y analíticos que pudieran interferir en los niveles de amonio en sangre. En el grupo de pacientes con cirrosis hepática, no se encontraron diferencias significativas en función de la edad (p=0,107), del sexo (p=0,085), de los factores de riesgo cardiovascular: síndrome metabólico (p=0,269), HTA (p=0,917), DM

( $p=0,143$ ) y DL ( $p=0,432$ ); o de la presencia de comorbilidades: cardiopatía ( $p=0,765$ ), enfermedad pulmonar crónica ( $p=0,810$ ) o enfermedad renal crónica ( $p=0,185$ ). Tampoco se encontraron diferencias acorde a la etiología de la cirrosis: alcohol ( $p=0,571$ ), VHC ( $p=0,093$ ), EHGNA ( $p=0,589$ ) u otras ( $p=0,140$ ); el tratamiento etiológico ( $p=0,228$ ), la utilización de otros tratamientos: IBP ( $p=0,698$ ); metformina ( $p=0,119$ ); benzodiazepinas ( $p=0,946$ ); BBNC ( $p=0,893$ ); norfloxacino ( $p=0,387$ ) o lactulosa ( $p=0,606$ ); el grado de función hepática: Child-Pugh ( $p=0,579$ ) o MELD ( $p=0,204$ ); o la mayoría de las descompensaciones previas: HDA ( $p=0,491$ ); PBE ( $p=0,435$ ); SHR ( $p=0,533$ ) o fallo hepático agudo sobre crónico (ACLF -acute-on-chronic liver failure-) ( $p=0,707$ ). Si que se encontraron niveles superiores de amonio en pacientes con HTP (media de  $34 \pm 4$  vs  $10 \pm 2$   $\mu\text{mol/L}$ ; diferencia de las medias de  $24$   $\mu\text{mol/L}$ ; IC95= $15-33$ ;  $p<0,001$ ), ascitis (media de  $41 \pm 6$  vs  $25 \pm 5$   $\mu\text{mol/L}$ ; diferencia de las medias de  $16$   $\mu\text{mol/L}$ ; IC95= $0,4-3$ ;  $p=0,044$ ) y utilización de diuréticos (media de  $43 \pm 7$  vs  $22 \pm 4$   $\mu\text{mol/L}$ ; diferencia de las medias de  $22$ ; IC95= $7-36$ ;  $p=0,006$ ).

De forma similar, el nivel de amonio en sangre periférica mostró una correlación negativa moderada con el nivel de albúmina ( $r=-0,430$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 33) y de plaquetas ( $r=-0,491$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 34); sin relación significativa con otros valores analíticos.



**Figura 33.** Correlació lineal entre el nivell de amonio i de albúmina en sang.

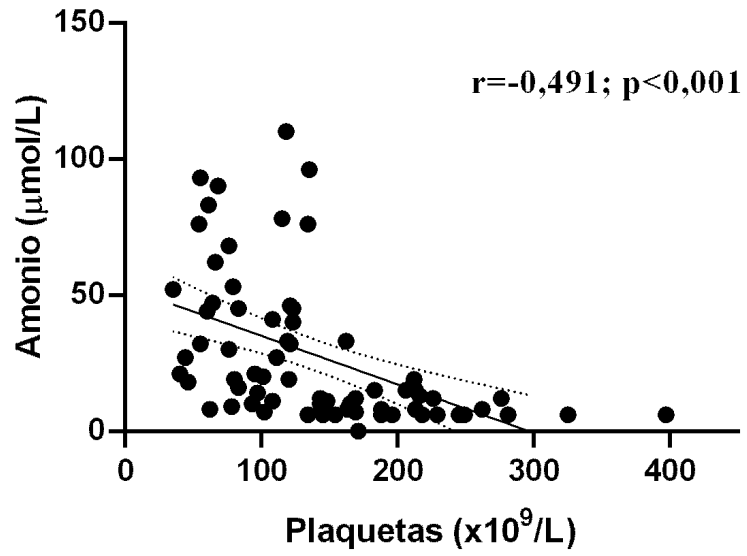


Figura 34. Correlación lineal entre el nivel de amonio y de plaquetas en sangre.

## 5. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES INMUNITARIAS

### 5.1. Estudio del inmunofenotipo

Se realizó el estudio de las poblaciones leucocitarias y se observó que los pacientes con cirrosis hepática presentaban, en forma de tendencia, un número total de leucocitos en sangre periférica inferior a los controles (media de  $5,5 \pm 3$  vs  $6,8 \pm 0,7 \times 10^9/L$ , respectivamente; diferencia de las medias de  $1,3 \pm 0,7 \times 10^9/L$ , IC95=0,1-2,6;  $p=0,065$ ). No se observaron estas diferencias entre los grupos de pacientes con y sin EHM (media de  $5,4 \pm 0,4$  vs  $5,7 \pm 0,5 \times 10^9/L$ , respectivamente; diferencias de las medias de  $0,3 \pm 0,6 \times 10^9/L$ , IC95=-0,8-1,5,  $p=0,566$ ).

Asimismo, los pacientes con cirrosis hepática presentaron, respecto a los controles, un porcentaje reducido de monocitos clásicos antiinflamatorios (CD14++CD16-), y un porcentaje aumentado de monocitos intermedios proinflamatorios (CD14++CD16+); más marcados en el caso de pacientes con EHM ( $p<0,001$ ) (Tabla 23, Figura 35).

La presencia de EHM se relacionó con un aumento en el porcentaje de linfocitos T autorreactivos (CD4+CD28-) y un descenso en el porcentaje de linfocitos T no autorreactivos (CD4+CD28+) (Tabla 23, Figura 36).

También se observó que pacientes con EHM presentaban, respecto a los pacientes sin EHM y a los controles, un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ activados (CD69), tanto autorreactivos como no autorreactivos (Tabla 23, Figura 37).

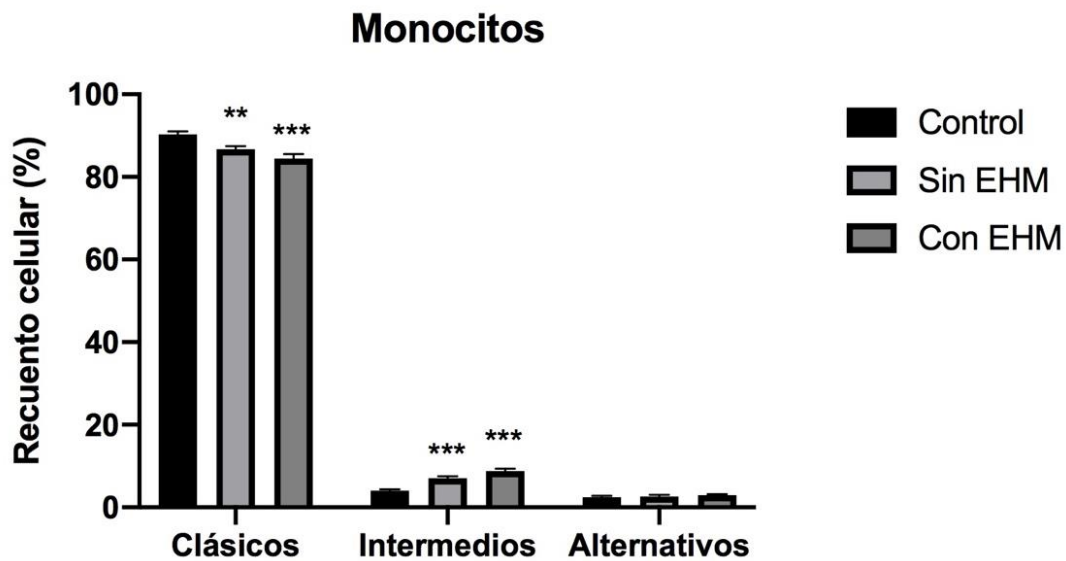


**Tabla 23.** Poblaciones leucocitarias en sangre periférica en los grupos del estudio.

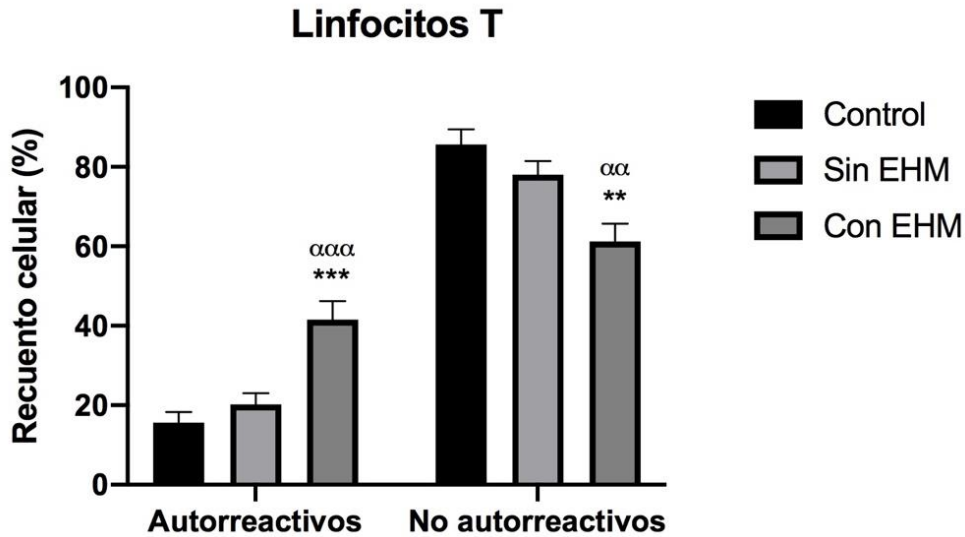
Población leucocitaria	Controles (n=30)	Pacientes (n=63)	
		Sin EHM (n=31)	Con EHM (n=32)
<b>Monocitos (%)</b>			
- Clásicos	90,3 (0,8)	86,7 (0,7)**	84,5 (1,1)***
- Intermedios	4,1 (0,3)	7,0 (0,5)***	8,8 (0,6)***
- Alternativos	2,4 (0,4)	2,6 (0,4)	2,9 (0,3)
<b>Linfocitos T (%)</b>			
- Autorreactivos	15,4 (2,7)	20,2 (2,8)	41,6 (4,6)***/ $\alpha\alpha\alpha$
- No autorreactivos	84,6 (3,8)	78,1 (3,4)	61,2 (4,5)**/ $\alpha\alpha$
<b>Linfocitos T activados (%)</b>			
- Autorreactivos	0,9 (0,1)	1,1 (0,1)	2,2 (0,3)***/ $\alpha\alpha\alpha$
- No autorreactivos	0,5 (0,1)	0,7 (0,2)	1,6 (0,4)**/ $\alpha$
- No autorreactivos	0,8 (0,1)	1,1 (0,1)	1,8 (0,3)*/ $\alpha$

Los valores se expresan como media (EEM).

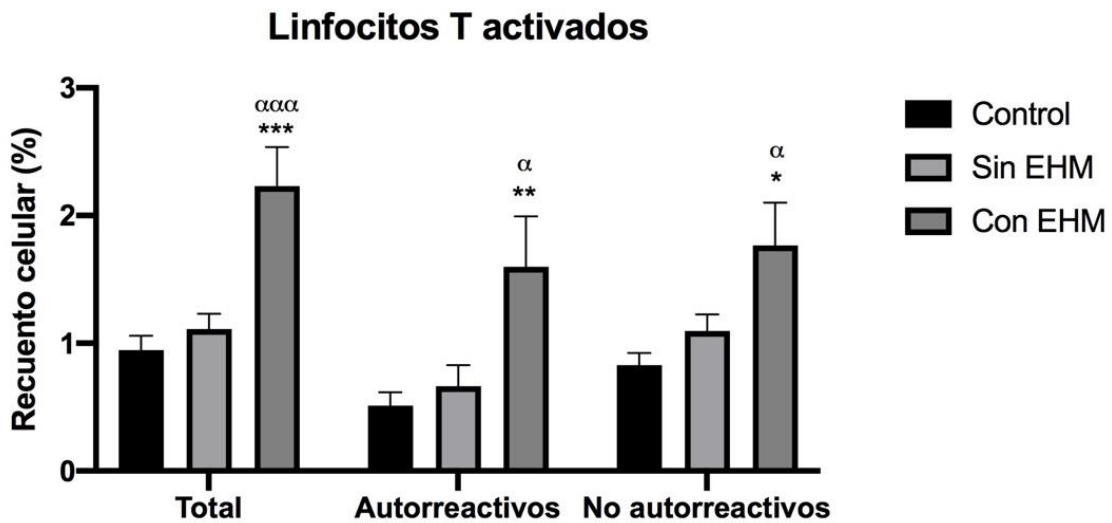
\*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).

**Figura 35.** Porcentaje de monocitos (media  $\pm$  EEM) clásicos, intermedios y alternativos en los grupos del estudio.

\*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).



**Figura 36.** Porcentaje de linfocitos T (media ± EEM) autorreactivos (CD4+CD28-) y no autorreactivos (CD4+CD28+) en los grupos del estudio.  
 \*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001); αsignificación estadística vs sin EHM (αp<0,05; ααp<0,01; αααp<0,001).



**Figura 37.** Porcentaje de linfocitos T (media ± EEM) activados (CD69+) totales, autorreactivos (CD4+CD28-) y no autorreactivos (CD4+CD28+) en los grupos del estudio.  
 \*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001); αsignificación estadística vs sin EHM (αp<0,05; ααp<0,01; αααp<0,001).

## 5.2. Determinación de citocinas en suero

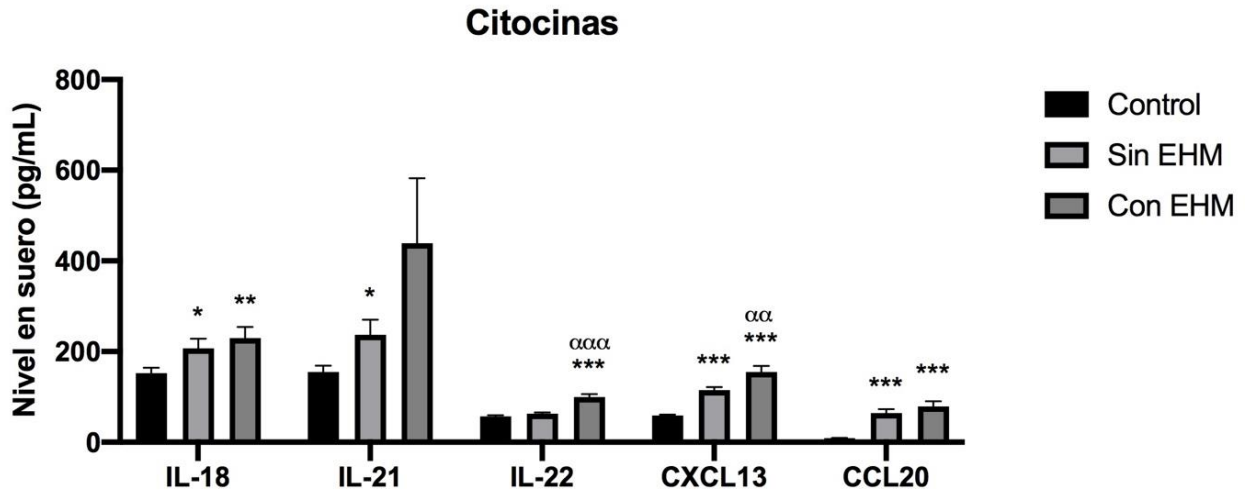
En pacientes con cirrosis hepática, la determinación de citocinas en suero mostró unos niveles superiores de IL-6 ( $p<0,001$ ), IL-18 ( $p=0,002$ ), IL-15 ( $p=0,013$ ), IL-17 ( $p=0,007$ ), IL-21 ( $p<=0,014$ ), IL-22 ( $p<0,001$ ), CXCL13 ( $p<0,001$ ), CX3CL1 ( $p<0,001$ ) y CCL20 ( $p<0,001$ ) comparado con el grupo de controles. No obstante, los pacientes sin EHM, a diferencia del grupo con EHM, no presentaron un aumento significativo de IL-22 respecto a los controles ( $p=0,084$ ). Se observaron también diferencias entre los grupos de pacientes con y sin EHM en los niveles de CXCL13 ( $p=0,004$ ) y CX3CL1 ( $p=0,004$ ) (Tabla 24, Figuras 38 y 39).

**Tabla 24.** Niveles de citocinas en suero en los grupos del estudio.

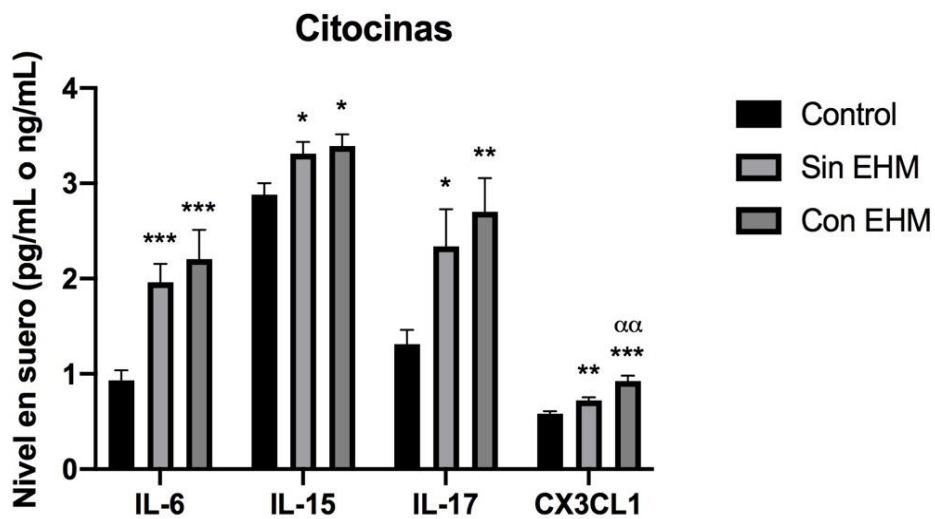
Citocinas	Controles (n=30)	Pacientes (n=63)	
		Sin EHM (n=31)	Con EHM (n=32)
<b>IL-6</b>	0,9 (0,1)	2,0 (0,2)***	2,2 (0,3)***
<b>IL-18</b>	152 (12)	207 (22)*	229 (25)**
<b>IL-15</b>	2,9 (0,1)	3,3 (0,1)*	3,4 (0,1)*
<b>IL-17</b>	1,3 (0,1)	2,3 (0,4)*	2,7 (0,4)**
<b>IL-21</b>	155 (14)	237 (33)*	439 (143)
<b>IL-22</b>	57 (2,5)	63 (2,6)	99 (6,8)***/ $\alpha\alpha\alpha$
<b>CXCL13</b>	59 (2,0)	115 (6,7)***	155 (13)***/ $\alpha\alpha$
<b>CX3CL1</b>	0,6 (0,03)	0,7 (0,04)**	0,9 (0,1)***/ $\alpha\alpha$
<b>CCL20</b>	8,9 (0,9)	64 (8,8)***	79 (11)***

Los valores se expresan como media (EEM) en pg/mL para todas excepto CX3CL1 en ng/mL.

\*significación estadística vs control (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p<0,05$ ;  $\alpha\alpha p<0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p<0,001$ ).



**Figura 38.** Niveles de citocinas (media  $\pm$  EEM) en pg/mL en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).



**Figura 39.** Niveles de citocinas (media  $\pm$  EEM) en pg/mL para IL-6, IL-15 e IL-17 y en ng/mL para CX3CL1 en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).

Se realizó un análisis de correlación entre el PHES y los niveles de citocinas en suero (Tabla 25). A su vez, se analizó la correlación entre los niveles de citocinas y los test psicométricos que mostraron un mejor rendimiento diagnóstico (Tabla 26).

**Tabla 25.** Análisis de correlación entre el PHES y los niveles de citocinas en suero.

Citocinas	r	p-valor
<b>IL-6</b>	-0,215	<b>0,039</b>
<b>IL-18</b>	-0,177	0,090
<b>IL-15</b>	-0,138	0,333
<b>IL-17</b>	-0,345	<b>0,001</b>
<b>IL-21</b>	-0,151	0,167
<b>IL-22</b>	-0,638	<b>&lt;0,001</b>
<b>CXCL13</b>	-0,612	<b>&lt;0,001</b>
<b>CX3CL1</b>	-0,370	<b>&lt;0,001</b>
<b>CCL20</b>	-0,357	<b>0,001</b>

Abreviaturas: r: coeficiente de correlación (Pearson).

**Tabla 26.** Análisis de correlación entre los test psicométricos y los niveles de citocinas en suero.

Citocinas	Test de claves oral		Tarea congruente del test de Stroop		Total de aciertos del d2	
	r	p-valor	r	p-valor	r	p-valor
<b>IL-6</b>	-0,298	<b>0,004</b>	-0,290	<b>0,005</b>	-0,254	<b>0,020</b>
<b>IL-18</b>	-0,185	0,078	-0,263	<b>0,012</b>	-0,141	0,201
<b>IL-15</b>	-0,159	0,265	-0,017	0,908	-0,503	<b>0,001</b>
<b>IL-17</b>	-0,236	<b>0,023</b>	-0,223	<b>0,033</b>	-0,088	0,428
<b>IL-21</b>	-0,139	0,208	-0,230	0,037	0,018	0,876
<b>IL-22</b>	-0,436	<b>&lt;0,001</b>	-0,519	<b>&lt;0,001</b>	-0,350	<b>0,001</b>
<b>CXCL13</b>	-0,523	<b>&lt;0,001</b>	-0,507	<b>&lt;0,001</b>	-0,375	<b>0,001</b>
<b>CX3CL1</b>	-0,418	<b>&lt;0,001</b>	-0,356	<b>0,001</b>	-0,312	<b>0,004</b>
<b>CCL20</b>	-0,336	<b>0,001</b>	-0,298	<b>0,005</b>	-0,314	<b>0,004</b>

Las citocinas que mostraron una mejor correlación con el PHES fueron la IL-22 ( $r=-0,638$ ;  $p<0,001$ ) y el CXCL13 ( $r=-0,612$ ;  $p<0,001$ ) de modo que, niveles crecientes de estas citocinas en suero se asociaron con una disminución en el PHES. La misma relación se observó entre los niveles de citocinas y la ejecución de otros test psicométricos centrados en evaluar alteraciones neurológicas concretas.

A continuación, se analizó el rendimiento de cada una de las citocinas para el diagnóstico de la EHM (Tablas 27).

**Tabla 27.** AUROC de las diferentes citocinas para el diagnóstico de EHM.

Citocinas	AUROC	IC95	p-valor
<b>IL-6</b>	0,525	0,376-0,674	0,731
<b>IL-18</b>	0,501	0,354-0,648	0,989
<b>IL-15</b>	0,541	0,359-0,724	0,700
<b>IL-17</b>	0,608	0,466-0,750	0,141
<b>IL-21</b>	0,468	0,303-0,633	0,690
<b>IL-22</b>	0,867	0,760-0,975	<b>&lt;0,000</b>
<b>CXCL13</b>	0,732	0,576-0,888	<b>0,010</b>
<b>CX3CL1</b>	0,701	0,569-0,833	<b>0,006</b>
<b>CCL20</b>	0,584	0,438-0,730	0,264

**Abreviaturas:** AUROC: área bajo la curva ROC; IC95: intervalo de confianza del 95%.

Nuevamente, la IL-22 mostró la mejor AUROC para el diagnóstico de EHM de forma que niveles superiores a 79,5 pg/mL permitieron discriminar la presencia de EHM con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 87%.

Se analizaron factores clínicos y analíticos que pudieran interferir en los niveles de IL-22 en sangre. No se encontraron diferencias significativas en función de la edad ( $p=0,670$ ), del sexo ( $p=0,138$ ), de los factores de riesgo cardiovascular: síndrome metabólico ( $p=0,645$ ), HTA ( $p=0,325$ ), DM ( $p=0,913$ ) y DL ( $p=0,886$ ); o de la presencia de comorbilidades: cardiopatía ( $p=0,938$ ), enfermedad pulmonar crónica ( $p=0,181$ ) o enfermedad renal crónica ( $p=0,116$ ). Los pacientes con cirrosis por el VHC presentaron, en forma de tenencia, niveles inferiores de IL-22 ( $70 \pm 5$  vs  $84 \pm 5$  pg/mL;  $p=0,054$ ) mientras que los pacientes con EHGNA presentaron niveles superiores ( $103 \pm 13$  vs  $78 \pm 4$  pg/mL;  $p=0,090$ ). El tratamiento etiológico de la cirrosis también mostró una tendencia a presentar niveles inferiores de IL-22 ( $76 \pm 5$  vs  $102 \pm 9$  pg/mL;  $0,063$ ). En cuanto a otros tratamientos, se observaron niveles superiores de IL-22 en pacientes que tomaban norfloxacino como profilaxis de la PBE ( $119 \pm 18$  vs  $77 \pm 4$  pg/mL;  $p=0,004$ ), sin diferencias significativas con la administración de otros fármacos. No se observó relación entre los niveles de IL-22 y el grado de función hepática: Child-Pugh ( $p=0,303$ ) o MELD ( $p=0,341$ ), aunque sí se vieron niveles superiores de esta citocina en pacientes con cirrosis

descompensada ( $91 \pm 7$  vs  $70 \pm 4$  pg/mL;  $p=0,012$ ), a expensas de ascitis ( $90 \pm 8$  vs  $73 \pm 4$ ;  $p=0,065$ ) y fundamentalmente PBE ( $109 \pm 14$  vs  $78 \pm 4$ ;  $p=0,035$ ). No se observó ninguna correlación entre los niveles de IL-22 y otras variables analíticas excepto con los niveles de amonio ( $r=0,256$ ;  $p=0,016$ ). Los pacientes con niveles de amonio por encima del límite superior de la normalidad ( $>32$   $\mu\text{mol/L}$ ), presentaron valores de IL-22 superiores a los pacientes con niveles de amonio en rango ( $\leq 32$   $\mu\text{mol/L}$ ) (media de  $82 \pm 7$  vs  $69 \pm 3$ ;  $p=0,071$ ).

Se realizó un análisis multivariante incluyendo la IL-22 y el amonio, manteniéndose únicamente los niveles ascendentes de IL-22 como factor independiente de EHM (OR=1,054; IC95=1,023-1,086;  $p=0,001$  para la IL-22; OR=1,025, IC95=0,997-1,053;  $p=0,077$  para el amonio).

### 5.3. Análisis de factores de transcripción

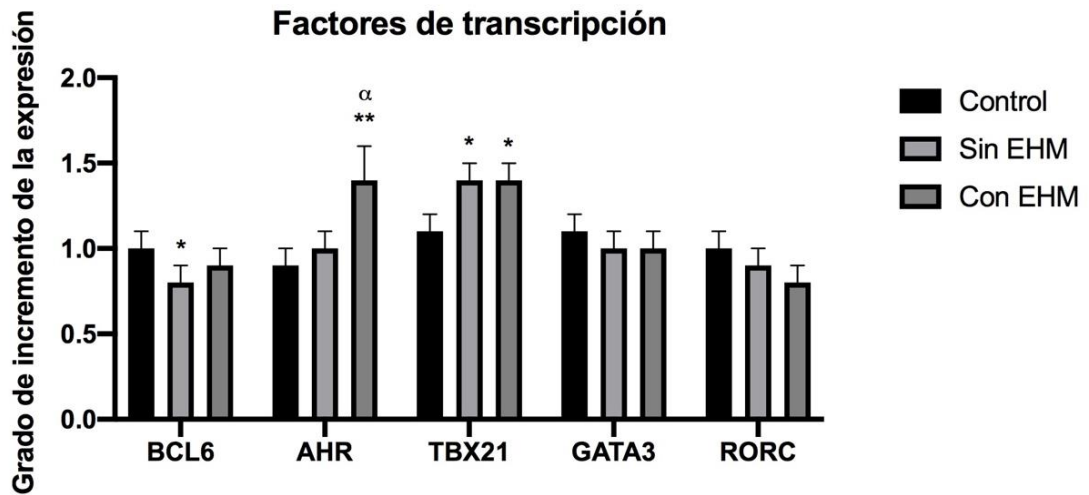
El análisis de los factores de transcripción demostró que los pacientes con cirrosis hepática presentaban una mayor expresión de los genes AHR ( $p=0,009$ ) y TBX21 ( $p=0,015$ ) respecto a los controles; siendo para el gen AHR a expensas del grupo con EHM. No se observaron diferencias significativas entre pacientes con cirrosis y controles en la expresión de BCL6 ( $p=0,104$ ), GATA3 ( $p=0,308$ ) o RORC ( $p=0,217$ ) (Tabla 28, Figura 40).

**Tabla 28.** Expresión de factores de transcripción característicos de subpoblaciones de linfocitos T en los distintos grupos del estudio.

Factor de transcripción	Controles (n=30)	Pacientes (n=63)	
		Sin EHM (n=31)	Con EHM (n=32)
<b>BCL6</b>	1,0 (0,1)	0,8 (0,1)*	0,9 (0,1)
<b>AHR</b>	0,9 (0,1)	1,0 (0,1)	1,4 (0,2)**/ $\alpha$
<b>TBX21</b>	1,1 (0,1)	1,4 (0,1)*	1,4 (0,1)*
<b>GATA3</b>	1,1 (0,1)	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)
<b>RORC</b>	1,0 (0,1)	0,9 (0,1)	0,8 (0,1)

Los valores se expresan como media (EEM).

\*significación estadística vs control (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p<0,05$ ;  $\alpha\alpha p<0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p<0,001$ ).



**Figura 40.** Grado de incremento en la expresión (media  $\pm$  EEM) de factores de transcripción característicos de subpoblaciones de linfocitos T en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).

Se realizó una correlación entre el PHES y los factores de transcripción (Tabla 28). Únicamente el AHR, característico de los linfocitos Th22, mostró una tendencia sin alcanzar la significación estadística (Tabla 29).

**Tabla 29.** Análisis de correlación entre el PHES y los niveles de expresión de factores de transcripción característicos de subpoblaciones de linfocitos T.

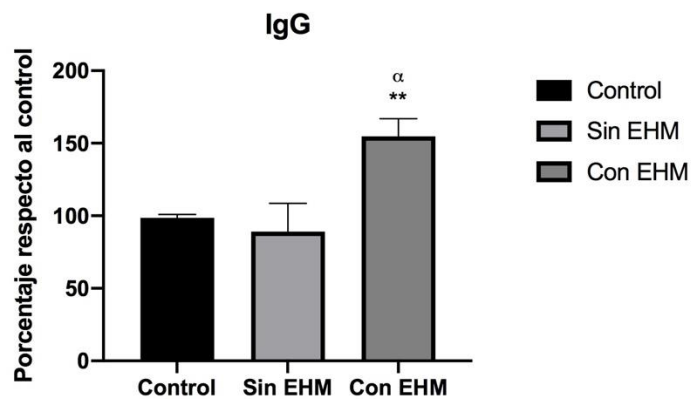
Factor de transcripción	r	p-valor
BCL6	0,035	0,765
AHR	-0,226	0,081
TBX21	-0,195	0,114
GATA3	0,046	0,704
RORC	0,109	0,359

Abreviaturas: r: coeficiente de correlación (Pearson).



#### 5.4. Determinación de niveles de IgG

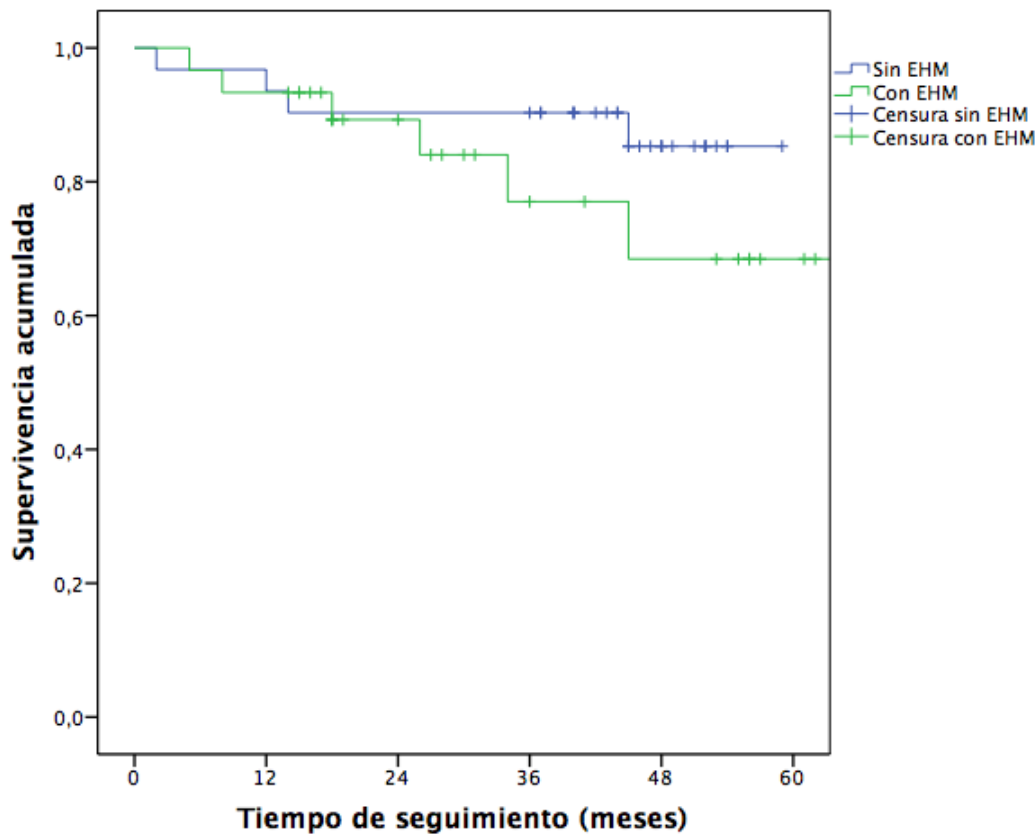
Se determinaron los niveles de IgG en plasma, y se observó que, en global los pacientes con cirrosis hepática presentaban niveles superiores a los controles (media de  $136 \pm 12$  vs  $99 \pm 2$ , respectivamente; diferencia de las medias de 38; IC95=12-64;  $p=0,007$ ); a expensas del grupo de pacientes con EHM (media de  $155 \pm 12$  vs  $89 \pm 20$  en pacientes sin EHM; diferencia de las medias de 66; IC95=17-114;  $p=0,011$ ) (Figura 41).



**Figura 41.** Porcentaje de variación en los niveles de IgG en plasma (media  $\pm$  EEM) respecto a los controles en pacientes con y sin EHM.  
 \*significación estadística vs control (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p<0,05$ ;  $\alpha\alpha p<0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p<0,001$ ).

## 6. EVOLUCIÓN CLÍNICA Y ANALÍTICA

Se realizó un seguimiento de los pacientes con cirrosis hepática con una pérdida (1,6%) en el grupo de pacientes con EHM y 12 fallecimientos: 8 (25%) en el grupo con EHM y 4 (13%) en el grupo sin EHM (OR=2,3; IC95=0,6-8,4; p=0,222) a lo largo del estudio. Las medias de supervivencia en los pacientes con y sin EHM fueron de  $59 \pm 5$  y  $53 \pm 3$  meses, respectivamente, sin diferencias significativas (log-rank 1,288; p=0,256) (Figura 42).

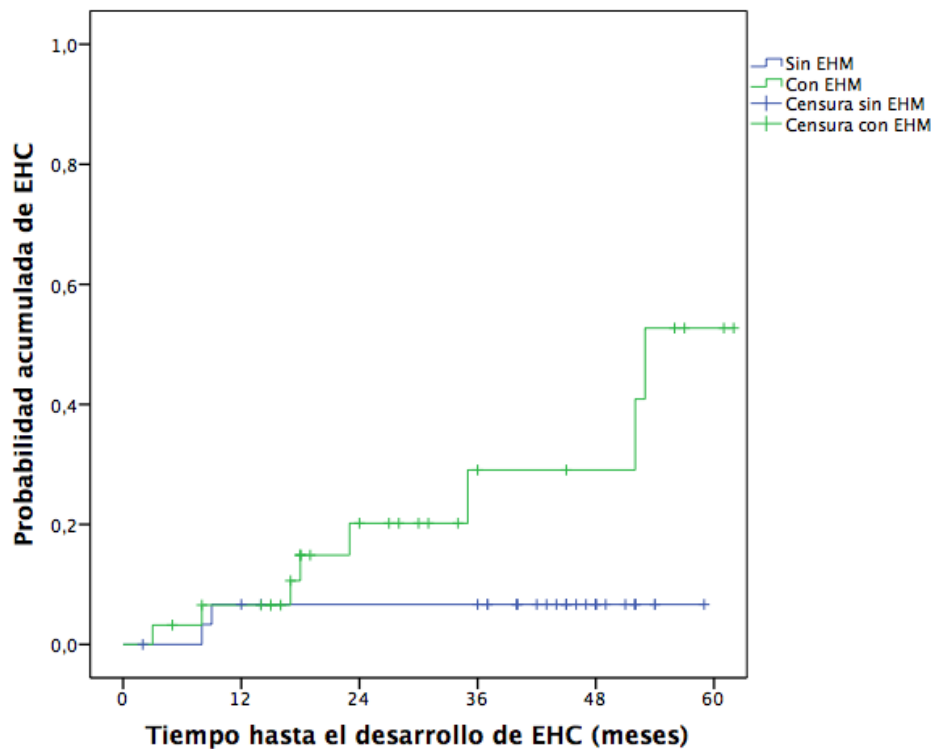


**Figura 42.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes con y sin EHM.

A lo largo del seguimiento un total de 10 pacientes desarrolló algún episodio de EHC: 8 (26%) en el grupo de pacientes con EHM y 2 (7%) en el grupo sin EHM (OR=5,043; IC95=1,02-26,1; p=0,038); la mayoría debido a infecciones bacterianas, alteraciones hidroelectrolíticas o estreñimiento. El tiempo hasta la aparición del episodio de EHC

también fue inferior en el grupo de pacientes con EHM (media de  $48 \pm 4$  vs  $56 \pm 2$  meses en el grupo sin EHM; Log-rank 4,672;  $p=0,031$ ) (Figura 43).

La probabilidad acumulada de desarrollo de EHC fue del 7%, 20% y 53% al año, 2 y 5 años, respectivamente, en el grupo de pacientes con EHM. En el grupo de pacientes sin EHM, la probabilidad acumulada durante el primer año fue del 7%, manteniéndose estable a lo largo de los siguientes 5 años.



**Figura 43.** Curva de Kaplan-Meier con la probabilidad y el tiempo hasta el desarrollo de encefalopatía hepática clínica en los pacientes con y sin EHM.

No se observaron diferencias entre ambos grupos de pacientes con y sin EHM en cuanto al desarrollo de otras descompensaciones ( $p=0,275$ ), trombosis portal ( $p=0,672$ ) o CHC ( $p=0,473$ ) a lo largo del seguimiento.

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los pacientes con y sin EHM en la evolución de los parámetros analíticos a los 3, 6 y 12 meses del inicio del estudio (Tabla 30).

**Tabla 30.** Evolución analítica de los pacientes con y sin EHM a los 3, 6 y 12 meses del inicio del estudio.

Variable	3 meses		6 meses		12 meses	
	Sin EHM (n=30)	Con EHM (n=31)	Sin EHM (n=29)	Con EHM (n=28)	Sin EHM (n=28)	Con EHM (n=26)
<b>Glucemia (mg/dL)</b>	112 (6)	133 (12)	116 (9)	141 (13)	113 (8)	133 (13)
<b>Parámetros nutricionales</b>						
- Col (mg/dL)	170 (12)	179 (6)	165 (9)	183 (8)	163 (12)	170 (9)
- Tg (mg/dL)	100 (14)	112 (12)	120 (20)	112 (12)	123 (25)	96 (10)
- Prot (g/dL)	7,3 (0,2)	7,4 (0,1)	7,4 (0,2)	7,0 (0,4)	7,5 (0,1)	7,4 (0,1)
<b>Función renal</b>						
- Urea (mg/dL)	33 (4)	38 (4)	34 (3)	32 (3)	38 (4)	36 (4)
- Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,06)	0,8 (0,03)	0,9 (0,08)	0,8 (0,04)	0,9 (0,07)	0,9 (0,1)
- Sodio (mEq/L)	139 (0,8)	139 (0,7)	139 (1)	139 (0,9)	140 (1)	139 (0,6)
<b>Enzimas hepáticas</b>						
- AST (U/L)	61 (14)	42 (4)	43 (4)	43 (4)	39 (4)	39 (3)
- ALT (U/L)	42 (6)	31 (2)	34 (3)	31 (3)	28 (3)	27 (2)
- GGT (U/L)	124 (21)	76 (10)	95 (17)	76 (9)	92 (15)	73 (12)
- FA (mU/mL)	130 (14)	131 (10)	102 (8)	125 (13)	111 (11)	135 (15)
<b>Función hepática</b>						
- Bil (mg/dL)	1,4 (0,2)	1,7 (0,4)	1,2 (0,2)	1,5 (0,3)	1,1 (0,2)	1,4 (0,2)
- Alb (g/dL)	3,8 (0,1)	3,7 (0,1)	3,9 (0,1)	3,7 (0,1)	4,0 (0,2)	3,7 (0,1)
- INR	1,2 (0,04)	1,2 (0,04)	1,2 (0,05)	1,3 (0,05)	1,2 (0,04)	1,6 (0,3)
<b>Hemograma</b>						
- Leuc ( $\times 10^9/L$ )	5,3 (0,5)	4,8 (0,3)	5,4 (0,4)	5,5 (0,4)	5,8 (0,5)	5,8 (0,6)
- Hgb (g/dL)	13,0 (0,6)	13,2 (0,4)	13,7 (0,4)	13,4 (0,4)	13,7 (0,5)	13,01 (0,6)
- Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	107 (11)	105 (9)	111 (10)	117 (10)	126 (13)	117 (14)

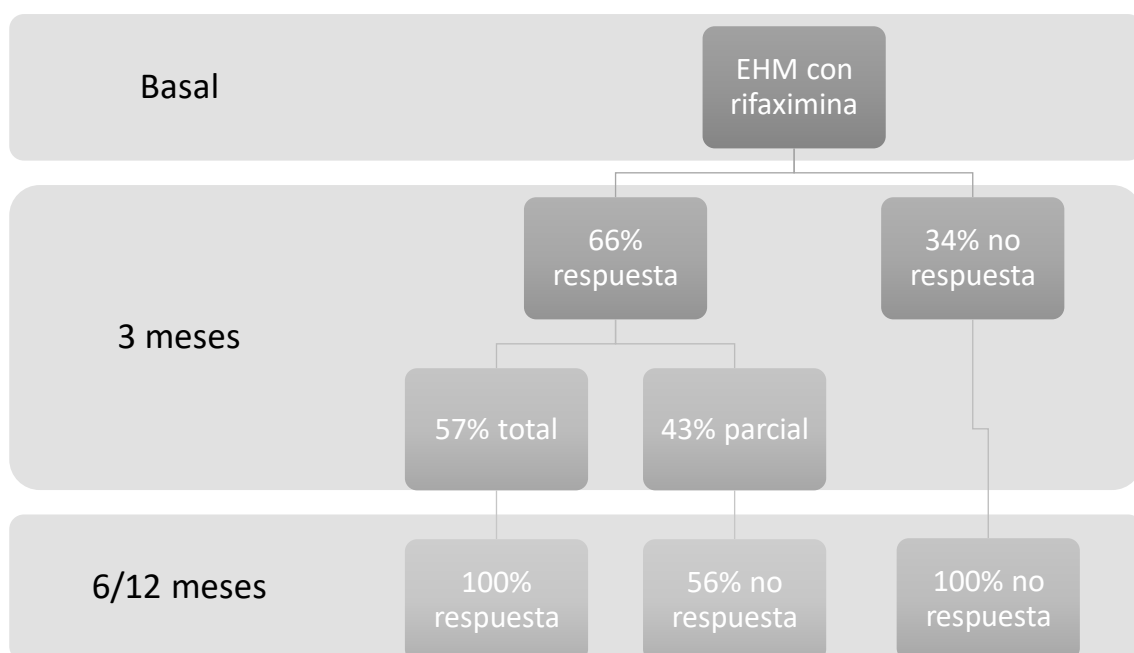
Los valores se expresan como media (error estándar de la media).

significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha \alpha p < 0,01$ ;  $\alpha \alpha \alpha p < 0,001$ ).

**Abreviaturas:** Col: colesterol; Tg: triglicéridos; Prot: proteínas; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transferasa; FA: fosfatasa alcalina; Bil: bilirrubina; Alb: albúmina; INR: ratio internacional normalizado; Leuc: leucocitos; Hgb: hemoglobina; Plaquetas: plaquetas.

## 7. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA

Todos los pacientes con EHM recibieron tratamiento con rifaximina 400mg/8h vía oral y se repitieron el PHES. A los 3 meses del tratamiento, 21 (66%) pacientes fueron respondedores acorde con el PHES. De estos, 12 (57%) presentaron una respuesta total y 9 (43%) parcial. Ninguno de los pacientes con EHM no respondedores a los 3 meses, mejoró el PHES a los 6 ni a los 12 meses. De los respondedores, 5 (24%) empeoraron el PHES a los 6 y/o 12 meses, todos respondedores parciales a los 3 meses (Figura 44).

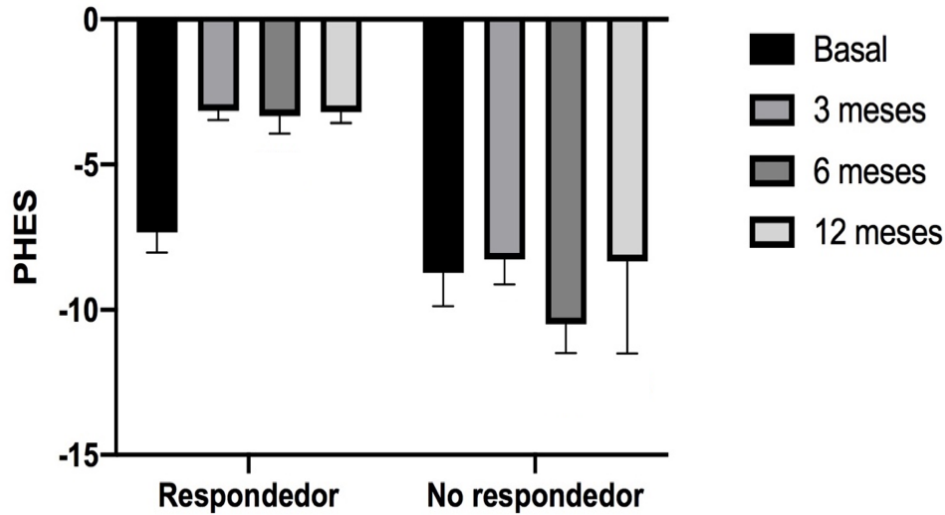


**Figura 44.** Flujo de respuesta al tratamiento con rifaximina a los 3, 6 y 12 meses.

La media del PHES en el grupo de pacientes respondedores fue de  $-7,3 \pm 0,7$ ,  $-3,2 \pm 0,3$ ,  $-3,3 \pm 0,6$  y  $-3,2 \pm 0,4$ , al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses. En el grupo de no respondedores, la media del PHES fue de  $-8,7 \pm 1,1$ ,  $-8,3 \pm 0,9$ ,  $-10,5 \pm 0,9$  y  $-8,3 \pm 3$ , basal, a los 3, 6 y 12 meses, respectivamente (Figura 45).

La duración media del tratamiento fue de  $20 \pm 3$  meses. Se registraron efectos adversos en 4 (14%) pacientes (2 cefaleas, 1 mareo y 1 agresividad). Se retiró el fármaco en tres de los casos (2 no respondedores y 1 respondedor) con mejoría sintomática y se

mantuvo en uno de los pacientes con cefalea (respondedor) en el que se pudo controlar los síntomas con analgesia convencional.



**Figura 45.** Valores del PHES (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.

Un 72% de pacientes fueron adherentes al tratamiento. La adherencia se relacionó con la respuesta en global (78% *vs* 29% en adherentes y no adherentes; OR=8,8; IC95=1,2-63,4;  $p=0,021$ ) y con la respuesta total (44% *vs* 0%; OR=1,8; IC95=1,2-2,7;  $p=0,032$ ).

### 7.1. Factores clínicos y analíticos.

Se analizaron los factores clínicos en función de la respuesta al tratamiento y se observó que la mayor edad, los factores de riesgo cardiovascular y la cirrosis por EHGNA se asociaban a una peor respuesta a la rifaximina (Tabla 31).

No se observaron diferencias en la aparición de EHC ( $p=0,610$ ), otras descompensaciones de la cirrosis ( $p=0,283$ ), trombosis portal ( $p=1,000$ ) o CHC ( $p=1,000$ ) entre los grupos de pacientes respondedores y no respondedores a lo largo del seguimiento.

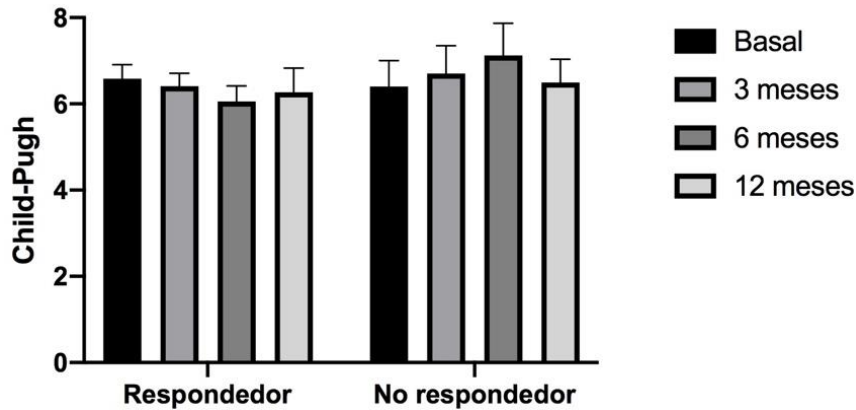
**Tabla 31.** Factores clínicos comparados según la respuesta a la rifaximina.

Variable	Respondedor (n=21)	No respondedor (n=11)	p-valor
<b>Edad (años), media (EEM)</b>	60 (2)	67 (2)	<b>0,012</b>
<b>Sexo M/F, n (%)</b>	18 (86)/3 (14)	9 (82)/2 (18)	1,000
<b>FRCV, n (%)</b>			
- Síndrome metabólico	2 (10)	5 (50)	<b>0,026</b>
- HTA	4 (20)	6 (60)	<b>0,045</b>
- DM	7 (33)	9 (90)	<b>0,006</b>
- DL	4 (20)	4 (40)	0,384
<b>Comorbilidades, n (%)</b>			
- Cardiopatía	1 (5)	1 (10)	1,000
- Enfermedad pulmonar	2 (11)	3 (33)	0,295
- Enfermedad renal crónica	0 (0)	2 (20)	---
<b>Edad al diagnóstico de la cirrosis, media (EEM)</b>	50 (3)	62 (6)	0,070
<b>Etiología de la CH, n (%)</b>			
- Alcohol	12 (57)	5 (46)	0,529
- VHC	4 (19)	1 (9)	0,637
- EHGNA	0 (0)	5 (46)	<b>0,002</b>
- Otras <sup>^</sup>	5 (24)	0 (0)	0,138
<b>Tratamiento etiológico, n (%)</b>	12 (80)	4 (67)	0,598
<b>Otros tratamientos, n (%)</b>			
- IBP	7 (35)	6 (54)	0,449
- Metformina	3 (15)	6 (60)	<b>0,030</b>
- Benzodicepinas	3 (15)	2 (20)	1,000
- BBNC	5 (25)	2 (20)	1,000
- Diuréticos	11 (55)	6 (60)	1,000
- Norfloxacino	3 (15)	1 (10)	1,000
- Lactulosa	2 (10)	2 (20)	0,584
<b>Hipertensión portal, n (%)</b>	15 (79)	10 (100)	0,268
<b>Child-Pugh, n (%)</b>			0,395
- A	11 (52)	8 (73)	
- B	9 (43)	2 (18)	
- C	1 (5)	1 (9)	
<b>MELD, media (EEM)</b>	10 (1)	10 (1)	0,795
<b>Descompensaciones, n (%)</b>	14 (67)	7 (64)	1,000
<b>Trombosis portal, n (%)</b>	3 (10)	3 (10)	1,000

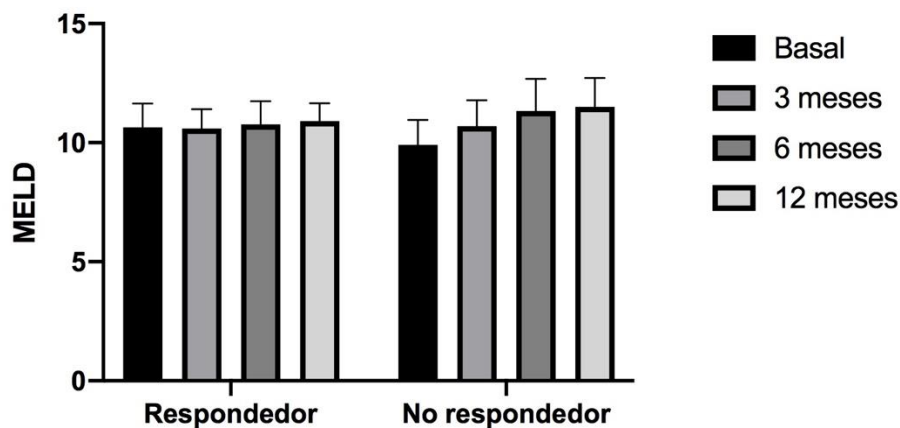
<sup>^</sup>VHB, colangitis biliar primaria, autoinmune, hemocromatosis o cirrosis criptogénica.

**Abreviaturas:** EEM: error estándar de la media; M/F: masculino/femenino; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; DL: dislipemia; EHGNA: enfermedad hepática grasa no alcohólica; VHC: virus de la hepatitis C; IBP: inhibidores de la bomba de protones; BBNC: beta-bloqueantes no cardioselectivos.

Aunque de forma no significativa, el Child-Pugh empeoró en el grupo de pacientes no respondedores a lo largo del seguimiento con una media de  $6,4 \pm 0,6$ ,  $6,7 \pm 0,7$ ,  $7,1 \pm 0,7$  y  $6,5 \pm 0,5$ , basal, a los 3, 6 y 12 meses, respectivamente (Figura 46). El MELD presentó una evolución similar con medias de  $9,9 \pm 1$ ,  $10,7 \pm 1$ ,  $11,3 \pm 1$ ,  $11,5 \pm 1$ , basal, a los 3, 6 y 12 meses (Figura 47).



**Figura 46.** Valores del Child-Pugh (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.  
<sup>a</sup>significación estadística vs basal (<sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup> $p < 0,01$ ; <sup>aaa</sup> $p < 0,001$ ); <sup>b</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>b</sup> $p < 0,05$ ; <sup>BB</sup> $p < 0,01$ ; <sup>BBB</sup> $p < 0,001$ ).



**Figura 47.** Valores del MELD (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.  
<sup>a</sup>significación estadística vs basal (<sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup> $p < 0,01$ ; <sup>aaa</sup> $p < 0,001$ ); <sup>b</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>b</sup> $p < 0,05$ ; <sup>BB</sup> $p < 0,01$ ; <sup>BBB</sup> $p < 0,001$ ).



Se analizaron los parámetros analíticos al inicio del estudio y a lo largo del seguimiento en función de la respuesta terapéutica. Los pacientes no respondedores presentaron niveles superiores de glucemia en ayunas. No se observaron otras diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 32 y 33).

**Tabla 32.** Valores analíticos comparados según la respuesta a la rifaximina.

Variable	Respondedor (n=21)	No respondedor (n=11)	p-valor
<b>Glucemia (mg/dL)</b>	104 (6)	142 (14)	<b>0,006</b>
<b>Parámetros nutricionales</b>			
- Col (mg/dL)	179 (6)	170 (12)	0,313
- Tg (mg/dL)	112 (12)	100 (14)	0,185
- Prot (g/dL)	7,4 (0,1)	7,3 (0,2)	0,510
<b>Función renal</b>			
- Urea (mg/dL)	33 (3)	41 (4)	0,063
- Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,04)	0,9 (0,09)	0,344
<b>Enzimas hepáticas</b>			
- AST (U/L)	43 (5)	34 (5)	0,257
- ALT (U/L)	33 (3)	28 (3)	0,338
- GGT (U/L)	81 (10)	78 (21)	0,895
- FA (mU/mL)	142 (15)	115 (18)	0,251
<b>Función hepática</b>			
- Bil (mg/dL)	1,9 (0,6)	1,3 (0,3)	0,447
- Alb (g/dL)	3,7 (0,1)	3,8 (0,2)	0,719
- INR	1,2 (0,1)	1,1 (0,1)	0,213
<b>Hemograma</b>			
- Leuc ( $\times 10^9/L$ )	4,8 (0,3)	5,3 (0,5)	0,809
- Hgb (g/dL)	13,2 (0,4)	13,0 (0,6)	0,883
- Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	105 (9)	107 (11)	0,937

Los valores se expresan como media (error estándar de la media).

**Abreviaturas:** Col: colesterol; Tg: triglicéridos; Prot: proteínas; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transferasa; FA: fosfatasa alcalina; Bil: bilirrubina; Alb: albúmina; INR: ratio internacional normalizado; Leuc: leucocitos; Hgb: hemoglobina; Plaquetas: plaquetas.

**Tabla 33.** Valores analíticos a los 3, 6 y 12 meses del tratamiento con rifaximina en los grupos de pacientes respondedores y no respondedores.

Variable	3 meses		6 meses		12 meses	
	Resp (n=21)	No resp (n=11)	Resp (n=19)	No resp (n=9)	Resp (n=18)	No resp (n=8)
<b>Glucemia (mg/dL)</b>	108 (9)	164 (15) <sup>BB</sup>	110 (10)	179 (14) <sup>BB</sup>	116 (12)	136 (8)
<b>Parámetros nutricionales</b>						
- Col (mg/dL)	181 (8)	175 (12)	183 (8)	165 (9)	174 (14)	161 (11)
- Tg (mg/dL)	93 (7)	149 (28)	112 (12)	120 (20) <sup>B</sup>	84 (6)	116 (25)
- Prot (g/dL)	7,4 (0,1)	7,4 (0,1)	7,0 (0,4)	7,4 (0,2)	7,3 (0,2)	7,5 (0,1)
<b>Función renal</b>						
- Urea (mg/dL)	34 (4)	47 (8)	29 (3)	38 (7)	31 (2)	45 (9)
- Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,06)	0,9 (0,15)	0,8 (0,05)	1,1 (0,2)	0,8 (0,1)	1,1 (0,2)
<b>Enzimas hepáticas</b>						
- AST (U/L)	48 (5)	34 (3)	45 (6)	39 (5)	41 (5)	37 (5)
- ALT (U/L)	34 (3)	26 (3)	33 (4)	27 (2)	29 (3)	24 (2)
- GGT (U/L)	76 (12)	76 (16)	71 (9)	89 (22)	61 (10)	89 (24)
- FA (mU/mL)	148 (13)	100 (14)	132 (15)	108 (24)	143 (20)	124 (22)
<b>Función hepática</b>						
- Bil (mg/dL)	1,9 (0,6)	1,4 (0,3)	1,5 (0,4)	1,5 (0,4)	1,4 (0,2)	1,4 (0,2)
- Alb (g/dL)	3,7 (0,1)	3,7 (0,2)	3,7 (0,1)	3,7 (0,3)	3,8 (0,2)	3,6 (0,2)
- INR	1,2 (0,05)	1,2 (0,07)	1,3 (0,07)	1,2 (0,05)	1,8 (0,5)	1,3 (0,1)
<b>Hemograma</b>						
- Leuc (x10 <sup>9</sup> /L)	4,8 (0,4)	4,6 (0,5)	5,4 (0,5)	5,7 (0,6)	5,9 (0,9)	5,7 (1)
- Hgb (g/dL)	13,5 (0,5)	12,5 (0,7)	13,9 (0,5)	12,8 (0,6)	13,5 (0,8)	12,6 (0,8)
- Plaqa (x10 <sup>9</sup> /L)	105 (12)	107 (17)	114 (13)	122 (15)	127 (19)	101 (18)

Los valores se expresan como media (error estándar de la media).

<sup>c</sup>significación estadística vs basal (<sup>c</sup>p<0,05; <sup>cc</sup>p<0,01; <sup>ccc</sup>p<0,001); <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).

**Abreviaturas:** Resp: respondedor; Col: colesterol; Tg: triglicéridos; Prot: proteínas; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transferasa; FA: fosfatasa alcalina; Bil: bilirrubina; Alb: albúmina; INR: ratio internacional normalizado; Leuc: leucocitos; Hgb: hemoglobina; Plaqa: plaquetas.

No se observaron diferencias en la supervivencia entre ambos grupos de respuesta terapéutica (Log-rank 0,870; p=0,251) con una media de 56 meses en ambos grupos.

## 7.2. Funciones cognitivas y motoras.

Se compararon los test psicométricos en función de la respuesta al tratamiento. No se observó que el valor del PHES al inicio del tratamiento influyera en la respuesta terapéutica ( $-7,3 \pm 0,7$  en pacientes respondedores vs  $-8,7 \pm 1,1$  en pacientes no respondedores;  $p=0,281$ ). Sí que se observó que pacientes respondedores, tenían una mejor ejecución en el test d2 en cuanto al total de respuestas, total de aciertos y efectividad total de la prueba, en el test de claves oral y en los test de coordinación (Tabla 34).

**Tabla 34.** Test psicométricos comparados según la respuesta a la rifaximina.

Variable	Respondedor (n=21)	No respondedor (n=11)	p-valor
<b>TEST COGNITIVOS</b>			
<b>Test de Stroop</b>			
- Tarea congruente <sup>a</sup>	73 (5)	67 (7)	0,531
- Tarea neutra <sup>b</sup>	58 (3)	51 (3)	0,204
- Tarea incongruente <sup>c</sup>	31 (3)	25 (2)	0,155
- Interferencia <sup>d</sup>	-1,4 (3)	-3,8 (2)	0,613
<b>Test d2</b>			
- TR	269 (19)	188 (26)	<b>0,024</b>
- TA	93 (8)	60 (13)	<b>0,037</b>
- O	22 (6)	19 (6)	0,764
- C	10 (4)	12 (5)	0,807
- TOT <sup>d</sup>	237 (18)	161 (29)	<b>0,032</b>
- CON <sup>d</sup>	83 (10)	49 (14)	0,068
<b>Test de claves oral</b>	29 (2)	18 (3)	<b>0,012</b>
<b>Test de dígitos oral</b>	11 (0,7)	9 (0,7)	0,095
<b>Test de letras y números oral</b>	6 (0,9)	4 (0,8)	0,123
<b>TEST MOTORES</b>			
<b>Coordinación bimanual</b>	3,0 (0,2)	4,7 (0,8)	0,070
<b>Coordinación visomotora</b>	3,5 (0,2)	4,5 (0,3)	<b>0,005</b>

Los valores se expresan como media (error estándar de la media).

<sup>a</sup>número de palabras, <sup>b</sup>número de colores, <sup>c</sup>número de ítems, <sup>d</sup>valor calculado.

**Abreviaturas:** TR: total de respuestas; TA: total de aciertos; O: omisiones; C: comisiones; TOT: efectividad total en la prueba; CON: índice de concentración.

La media del PHES pasó de  $-7,3 \pm 0,7$  a  $-3,2 \pm 0,3$  a los 3 meses del tratamiento en el grupo de pacientes respondedores. En los no respondedores, permaneció en  $-8,3 \pm 0,9$  hasta los 12 meses del tratamiento. Se analizó la evolución de las distintas alteraciones neurológicas evaluadas por los test psicométricos específicos, en ambos grupos de respuesta al tratamiento (Tabla 35).

**Tabla 35.** Test psicométricos a lo largo del seguimiento en ambos grupos.

Variable	3 meses		6 meses		12 meses	
	Resp (n=21)	No resp (n=11)	Resp (n=19)	No resp (n=9)	Resp (n=18)	No resp (n=8)
<b>TEST COGNITIVOS</b>						
<b>Test de Stroop</b>						
- Tarea congruente <sup>a</sup>	80 (5)	67 (5)	85 (5) <sup>o</sup>	64 (9) <sup>B</sup>	92 (11)	63 (9)
- Tarea neutra <sup>b</sup>	63 (3)	52 (3) <sup>B</sup>	64 (3) <sup>o</sup>	52 (4)	65 (2)	47 (9)
- Tarea incongruente <sup>c</sup>	35 (2)	27 (3) <sup>B</sup>	35 (2) <sup>o</sup>	34 (8)	44 (4)	29 (4)
- Interferencia <sup>d</sup>	0,3 (2)	-1,5 (2)	1 (2) <sup>o</sup>	6 (5)	6 (3)	2 (1)
<b>Test d2</b>						
- TR	307 (18)	179 (18) <sup>BB</sup>	295 (19)	219 (40)	353 (27)	259 (28)
- TA	111 (9)	64 (10) <sup>BB</sup>	108 (9)	71 (19) <sup>oo</sup>	144 (10)	103 (14)
- O	20 (4)	11 (3)	16 (6)	22 (2)	8 (3)	8 (4)
- C	3 (1) <sup>o</sup>	6 (4)	6 (3)	14 (6)	1 (1)	4 (5)
- TOT <sup>d</sup>	284 (19) <sup>o</sup>	161 (21) <sup>BB</sup>	274 (19)	184 (47)	344 (28)	246 (32)
- CON <sup>d</sup>	108 (19) <sup>o</sup>	58 (12) <sup>BB</sup>	102 (11)	57 (25)	143 (11)	99 (17)
<b>Test de claves oral</b>	33 (2)	20 (2) <sup>BB</sup>	37 (2)	20 (4) <sup>BB</sup>	40 (8)	23 (5)
<b>Test de dígitos oral</b>	11 (0,9)	9 (0,7)	13 (2)	10 (2)	14 (1)	9 (1)
<b>Test de letras y números oral</b>	7 (0,9)	5 (0,8)	7 (1)	3 (1)	8 (0)	4 (1)
<b>TEST MOTORES</b>						
<b>Coordinación bimanual</b>	2,6 (0,1) <sup>oo</sup>	3,7 (0,3) <sup>BB</sup>	2,7 (0,1)	4,0 (0,5) <sup>B</sup>	2,4 (0,2)	3,8 (0,8)
<b>Coordinación visomotora</b>	3,4 (0,2)	4,8 (0,7)	3,3 (0,3)	4,7 (0,4) <sup>B</sup>	2,7 (0,3)	3,6 (0,4)

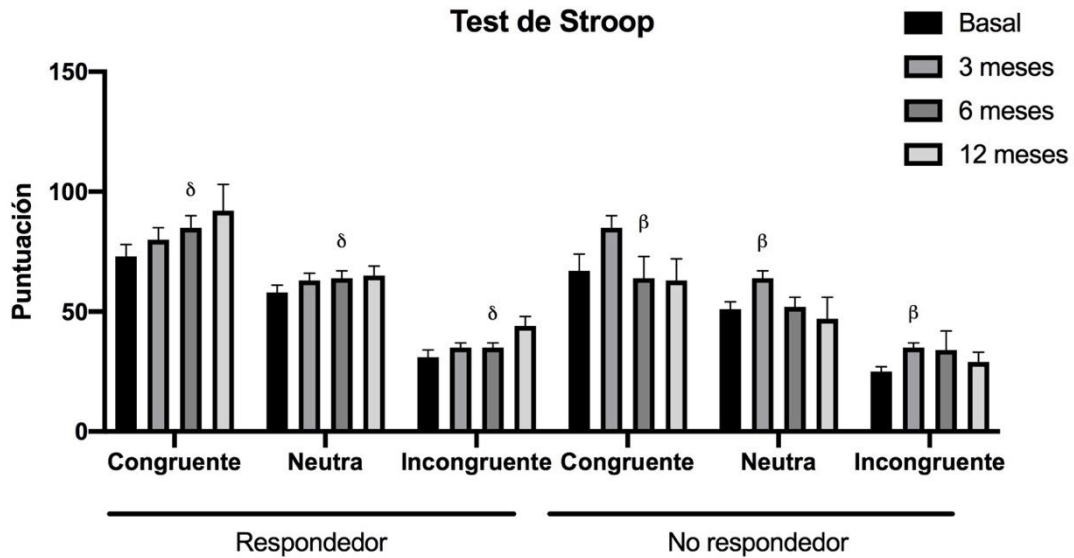
Los valores se expresan como media (error estándar de la media).

<sup>a</sup>número de palabras, <sup>b</sup>número de colores, <sup>c</sup>número de ítems, <sup>d</sup>valor calculado.

<sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001); <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).

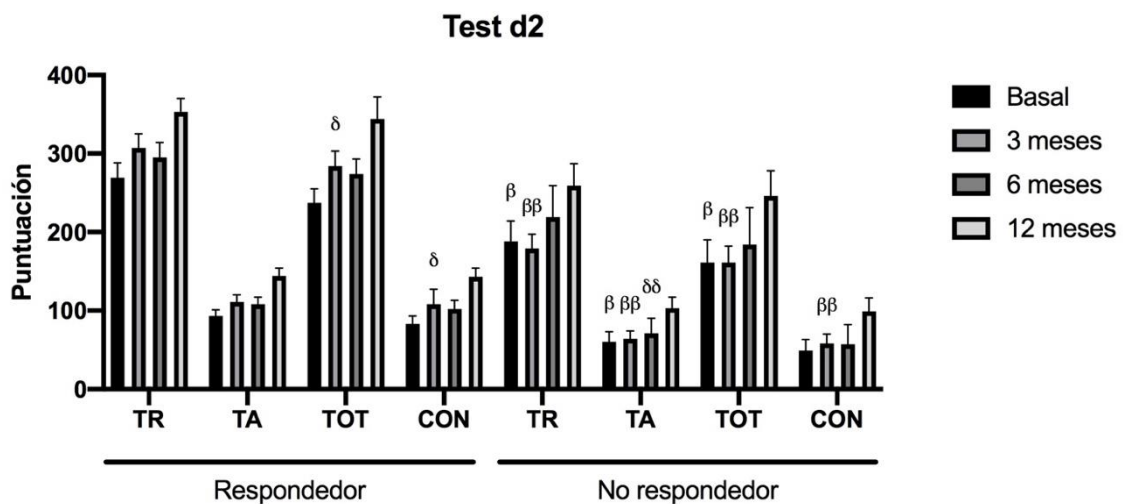
**Abreviaturas:** Resp: respondedor; TR: total de respuestas; TA: total de aciertos; O: omisiones; C: comisiones; TOT: efectividad total en la prueba; CON: índice de concentración.

Respecto a la ejecución basal, los pacientes respondedores presentaron una mejoría en la atención selectiva y flexibilidad cognitiva evaluada mediante el test de Stroop a lo largo del seguimiento (Figura 48).



**Figura 48.** Valores del test de Stroop (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.  $\delta$ significación estadística vs basal ( $\delta$ p<0,05;  $\delta\delta$ p<0,01;  $\delta\delta\delta$ p<0,001);  $\beta$ significación estadística vs respondedor ( $\beta$ p<0,05;  $\beta\beta$ p<0,01;  $\beta\beta\beta$ p<0,001).

También se observó una mejoría en la atención sostenida evaluada mediante la efectividad total de la prueba y la capacidad de concentración del test d2 en el grupo de pacientes respondedores (Figura 49).

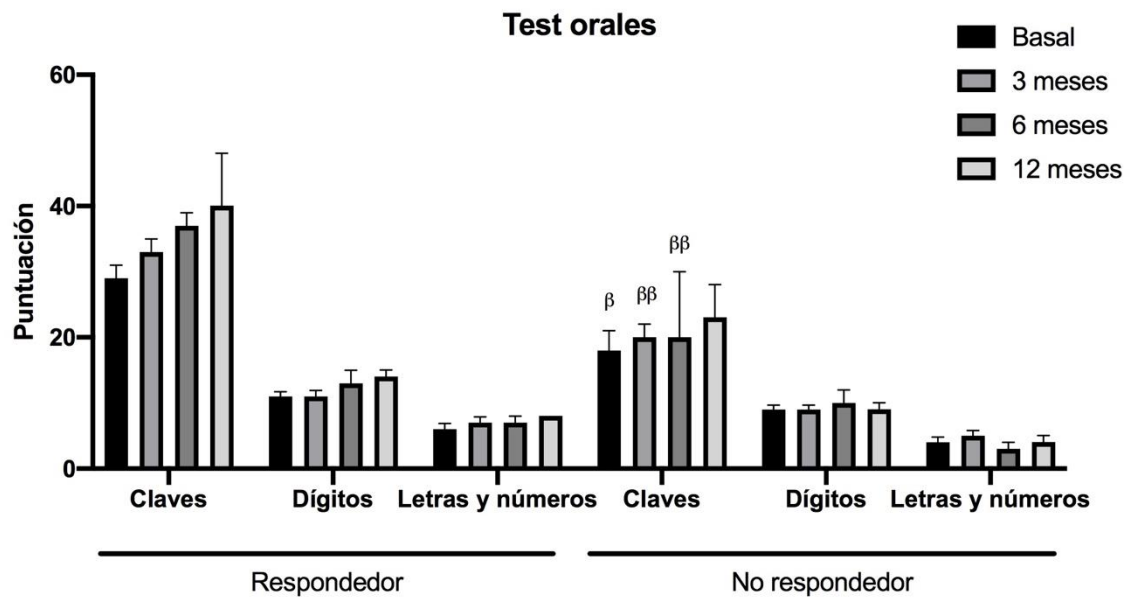


**Figura 49.** Puntuación del test d2 (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.  $\delta$ significación estadística vs basal ( $\delta$ p<0,05;  $\delta\delta$ p<0,01;  $\delta\delta\delta$ p<0,001);  $\beta$ significación estadística vs respondedor ( $\beta$ p<0,05;  $\beta\beta$ p<0,01;  $\beta\beta\beta$ p<0,001).

**Abreviaturas:** TR: total de respuestas; TA: total de aciertos; O: omisiones; C: comisiones; TOT: efectividad total en la prueba; CON: índice de concentración.

El grupo de pacientes respondedores presentó una mejoría progresiva en el test de claves oral a lo largo del seguimiento, con diferencias significativas respecto al grupo de pacientes no respondedores (Figura 49).

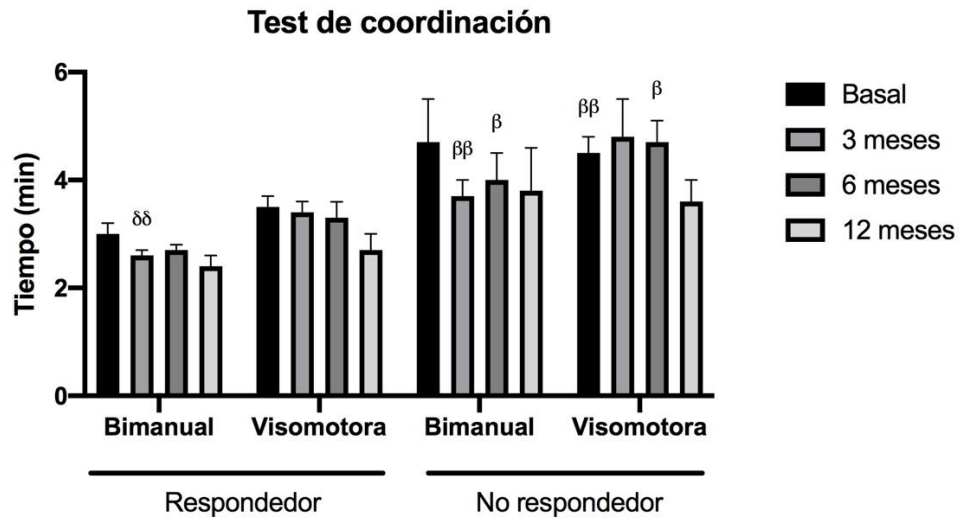
La respuesta en la memoria de trabajo evaluada por los test de dígitos y letras y números orales fue más discreta, sin diferencias significativas a lo largo del tratamiento ni entre pacientes respondedores y no respondedores (Figura 50).



**Figura 50.** Puntuación de los test orales (media ± EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.

<sup>α</sup>significación estadística vs basal (<sup>α</sup>p<0,05; <sup>αα</sup>p<0,01; <sup>ααα</sup>p<0,001); <sup>β</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>β</sup>p<0,05; <sup>ββ</sup>p<0,01; <sup>βββ</sup>p<0,001).

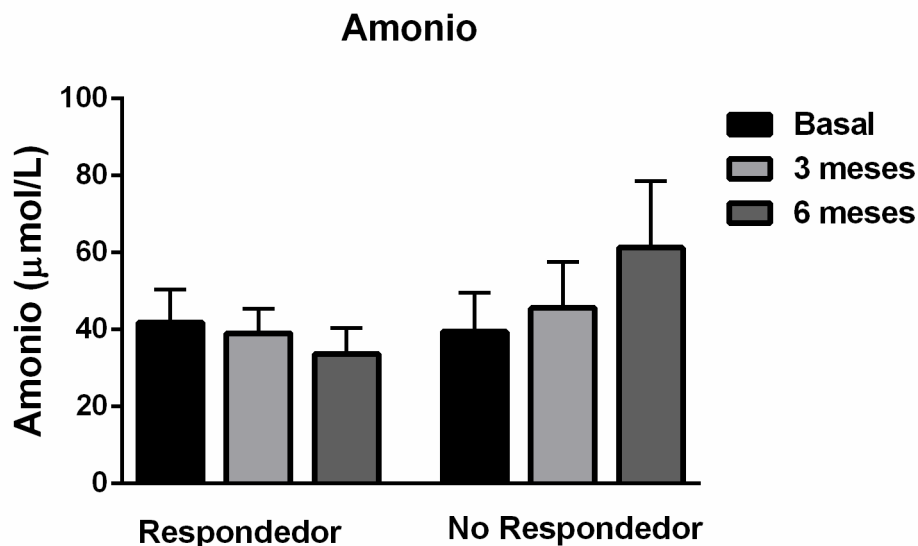
Los pacientes respondedores presentaron una reducción en el tiempo necesario para completar los test de coordinación a lo largo del seguimiento, con diferencias significativas respecto a los no respondedores (Figura 51).



**Figura 51.** Puntuación de los test de coordinación (media  $\pm$  EEM) en minutos en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses. <sup>°</sup>significación estadística vs basal (<sup>°</sup>p<0,05; <sup>°°</sup>p<0,01; <sup>°°°</sup>p<0,001); <sup>β</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>β</sup>p<0,05; <sup>ββ</sup>p<0,01; <sup>βββ</sup>p<0,001).

### 7.3. Niveles de amonio en sangre

Los niveles de amonio en sangre periférica al inicio del tratamiento fueron de  $42 \pm 9$  y  $39 \pm 10$   $\mu\text{mol/L}$  en los grupos de pacientes respondedores y no respondedores, sin diferencias significativas ( $p=0,862$ ). A lo largo del seguimiento, el grupo de pacientes respondedores presentó una reducción no significativa de los niveles, con valores de  $39 \pm 6$  y  $34 \pm 7$   $\mu\text{mol/L}$  a los 3 y 6 meses, respectivamente. Contrariamente, los pacientes no respondedores presentaron un aumento no significativo en los niveles de amonio en sangre, con valores de  $46 \pm 12$  y  $61 \pm 17$   $\mu\text{mol/L}$  a los 3 y 6 meses (Figura 52).



**Figura 52.** Niveles de amonio (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.

<sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup> $p < 0,05$ ; <sup>oo</sup> $p < 0,01$ ; <sup>ooo</sup> $p < 0,001$ );  
<sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup> $p < 0,05$ ; <sup>BB</sup> $p < 0,01$ ; <sup>BBB</sup> $p < 0,001$ ).



#### **7.4. Alteraciones inmunitarias**

Se realizó el estudio de las poblaciones leucocitarias a los 3 y 6 meses del inicio del tratamiento y se comparó en función de la respuesta terapéutica.

El tratamiento con rifaximina redujo el porcentaje de monocitos intermedios proinflamatorios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), alcanzando a los 6 meses un nivel similar al de los controles en el grupo de pacientes respondedores. Paralelamente, se produjo un aumento en el porcentaje de monocitos clásicos antiinflamatorios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) y una reducción en el de monocitos alternativos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) en ambos grupos de respuesta terapéutica, pero más marcado en el grupo de pacientes respondedores (Tabla 36, Figura 53).

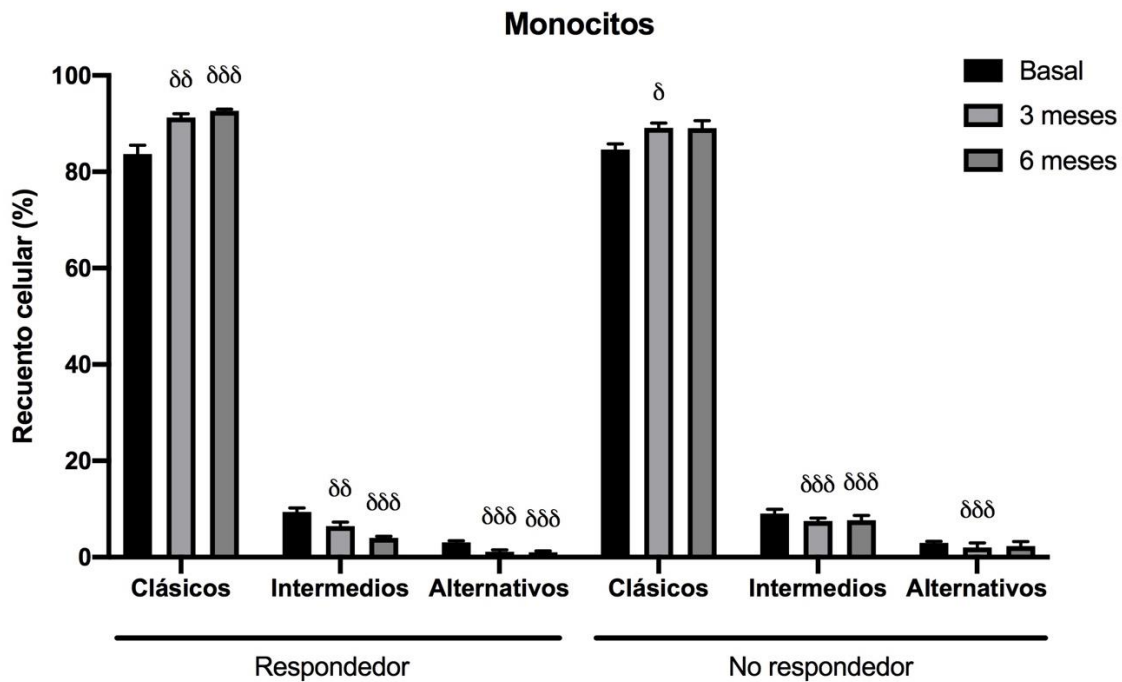
El tratamiento con rifaximina también indujo una reducción en el porcentaje linfocitos T autorreactivos (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) hasta valores casi normales y un aumento de linfocitos T no autorreactivos (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) en el grupo de pacientes respondedores. Contrariamente, los pacientes no respondedores mostraron un aumento en el porcentaje de linfocitos T autorreactivos (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) y un descenso en el de linfocitos T no autorreactivos (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) a los 3 y 6 meses del tratamiento (Tabla 36, Figura 54).

En cuanto al porcentaje de linfocitos T activados (CD69), los pacientes respondedores presentaron unos niveles basales elevados, tanto de linfocitos T autorreactivos como no autorreactivos activados, que fueron revertidos con la rifaximina. El grupo de pacientes no respondedores, no mostró niveles de activación elevados al inicio del tratamiento ni durante el seguimiento (Tabla 36, Figura 55).

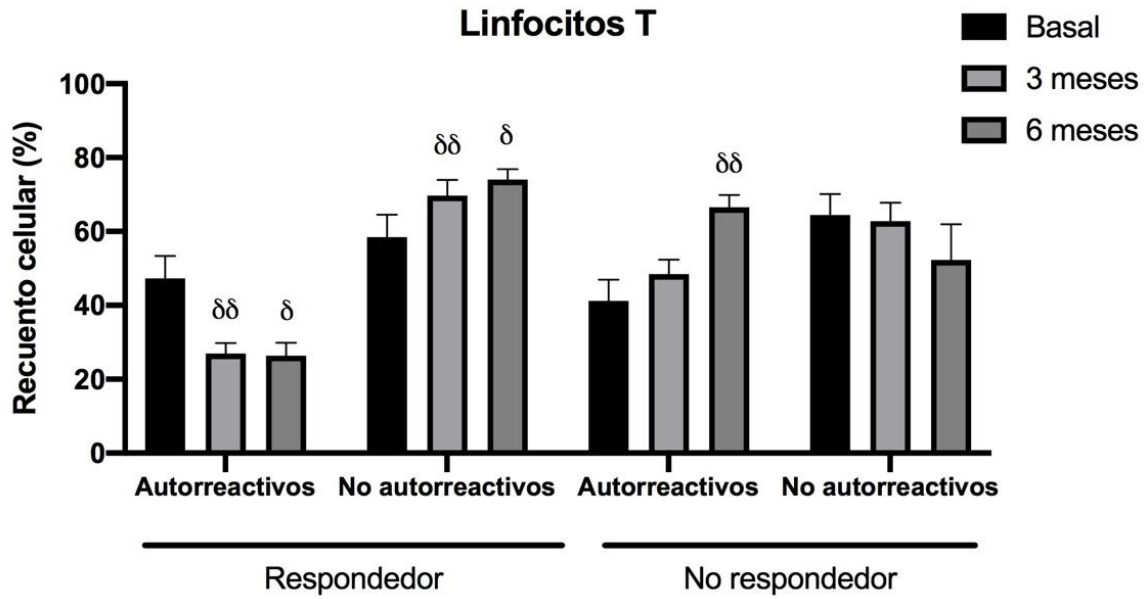
**Tabla 36.** Poblaciones leucocitarias en sangre periférica en los grupos de respuesta a la rifaximina al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.

Población leucocitaria	Basal		3 meses		6 meses	
	Resp (n=21)	No resp (n=11)	Resp (n=21)	No resp (n=11)	Resp (n=19)	No resp (n=9)
<b>Monocitos (%)</b>						
- Clásicos	83,7 (1,8)	84,6 (1,2)	91,3 (0,8) <sup>δδ</sup>	89,1 (1,0) <sup>δ</sup>	92,7 (0,3) <sup>δδδ</sup>	89,1 (1,6)
- Intermedios	9,4 (0,8)	9,1 (0,9)	6,5 (0,8) <sup>δδ</sup>	7,5 (0,6) <sup>δδδ</sup>	4,0 (0,3) <sup>δδδ</sup>	7,7 (1,0) <sup>δδδ</sup>
- Alternativos	3,1 (0,3)	3,0 (0,3)	1,1 (0,4) <sup>δδδ</sup>	2,0 (0,9) <sup>δδδ</sup>	1,0 (0,3) <sup>δδδ</sup>	2,3 (0,9)
<b>Linfocitos T (%)</b>						
- Autorreactivos	47,3 (6,1)	41,2 (5,8)	26,9 (2,9) <sup>δδ</sup>	48,4 (3,9)	26,4 (3,5) <sup>δ</sup>	66,5 (3,4) <sup>δδ</sup>
- No autorreactivos	58,4 (6,1)	64,5 (5,7)	69,7 (4,3) <sup>δδ</sup>	62,8 (5)	74,1 (2,8) <sup>δ</sup>	52,3 (9,7)
<b>Linfocitos T activados (%)</b>						
- Autorreactivos	2,8 (0,3)	0,6 (0,1)	1,0 (0,1) <sup>δδδ</sup>	0,6 (0,1)	0,7 (0,2) <sup>δδδ</sup>	0,6 (0,1)
- No autorreactivos	2,3 (0,3)	0,4 (0,1)	0,4 (0,1) <sup>δδδ</sup>	0,5 (0,1)	0,6 (0,1) <sup>δδ</sup>	0,5 (0,1)
- No autorreactivos	3,8 (0,4)	0,7 (0,1)	1,1 (0,1) <sup>δδδ</sup>	0,7 (0,1)	0,7 (0,2) <sup>δδδ</sup>	0,8 (0,1)

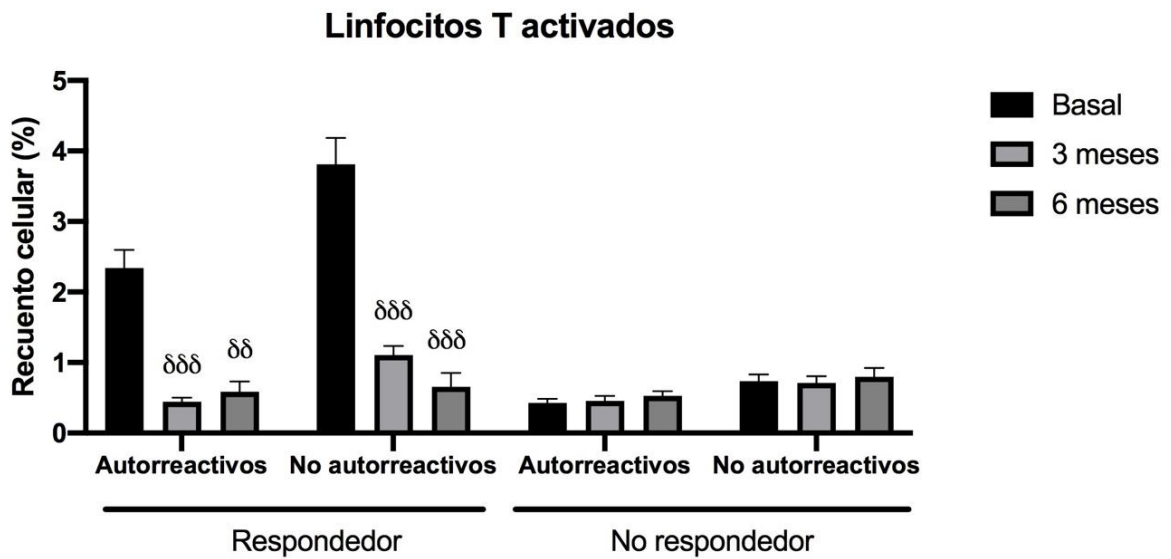
Los valores se expresan como media (error estándar de la media).  
<sup>δ</sup>significación estadística vs basal (<sup>δ</sup>p<0,05; <sup>δδ</sup>p<0,01; <sup>δδδ</sup>p<0,001).  
**Abreviaturas:** Resp: respondedor.



**Figura 53.** Porcentaje de monocitos (media ± EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.  
<sup>δ</sup>significación estadística vs basal (<sup>δ</sup>p<0,05; <sup>δδ</sup>p<0,01; <sup>δδδ</sup>p<0,001).



**Figura 54.** Porcentaje de linfocitos T (media ± EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.  
<sup>δ</sup>significación estadística vs basal (<sup>δ</sup>p<0,05; <sup>δδ</sup>p<0,01; <sup>δδδ</sup>p<0,001).



**Figura 55.** Porcentaje de linfocitos T activados (media ± EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.  
<sup>δ</sup>significación estadística vs basal (<sup>δ</sup>p<0,05; <sup>δδ</sup>p<0,01; <sup>δδδ</sup>p<0,001).

En cuanto al efecto de la rifaximina en los niveles de citocinas en suero se observó una reducción en los niveles de IL-17, IL-21, IL-22 y CXCL13 hasta niveles prácticamente similares a los pacientes sin EHM en el grupo de pacientes respondedores. En los no respondedores, los niveles de estas citocinas no disminuyeron o incluso aumentaron a lo largo del tiempo (Tabla 37, Figuras 56 y 57).

Un segundo tipo de respuesta se observó para los niveles de IL-6 e IL-15 que fueron reducidos tanto en el grupo de pacientes respondedores como no respondedores (Tabla 37, Figuras 57).

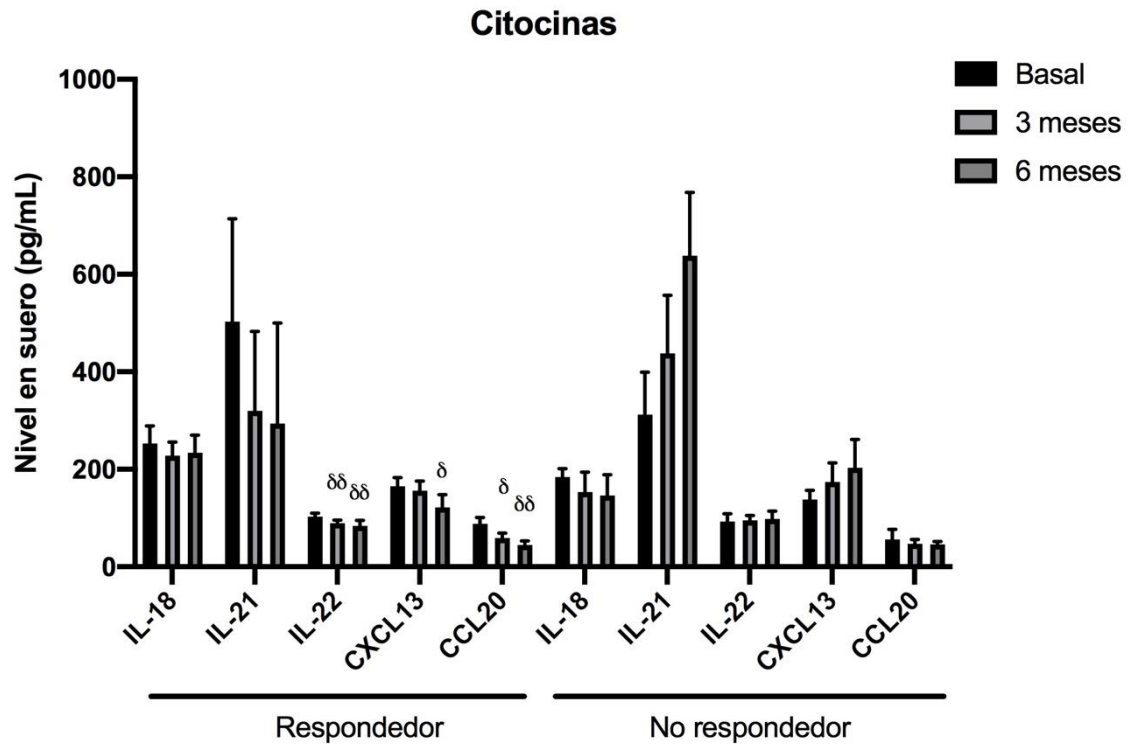
A diferencia de los pacientes respondedores, el grupo de no respondedores, presentaba niveles de IL-18 y CCL20 prácticamente normales al inicio del tratamiento (Tabla 37, Figuras 56).

**Tabla 37.** Niveles de citocinas en sangre periférica en los grupos de respuesta a la rifaximina al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.

Citocinas	Basal		3 meses		6 meses	
	Resp (n=21)	No resp (n=11)	Resp (n=21)	No resp (n=11)	Resp (n=19)	No resp (n=9)
IL-6	2,2 (0,4)	2,2 (0,6)	1,8 (0,4)	1,5 (0,6)	1,2 (0,3)	1,0 (0,5)
IL-18	253 (36)	184 (17)	228 (28)	153 (41)	234 (36)	146 (43)
IL-15	3,5 (0,6)	3,1 (0,7)	3,2 (0,1)	3,1 (0,2)	2,9 (0,1) <sup>o</sup>	3 (0,2)
IL-17	2,7 (0,5)	2,6 (0,5)	2,7 (0,5)	3,2 (1,0)	1,9 (0,3)	4,5 (1) <sup>BB</sup>
IL-21	503 (211)	312 (87)	320 (163)	438 (119)	294 (206)	638 (130)
IL-22	103 (6,7)	93 (16)	89 (6,8) <sup>o</sup>	95 (10)	84 (11) <sup>o</sup>	98 (16)
CXCL13	165 (18)	138 (19)	156 (20)	174 (39)	122 (26) <sup>o</sup>	203 (58)
CX3CL1	0,9 (0,1)	1,0 (0,1)	0,9 (0,1)	1,0 (0,1)	0,9 (0,1) <sup>o</sup>	1,1 (0,1)
CCL20	88 (13)	56 (21)	59 (10) <sup>o</sup>	47 (9)	45 (8) <sup>o</sup>	46 (6)

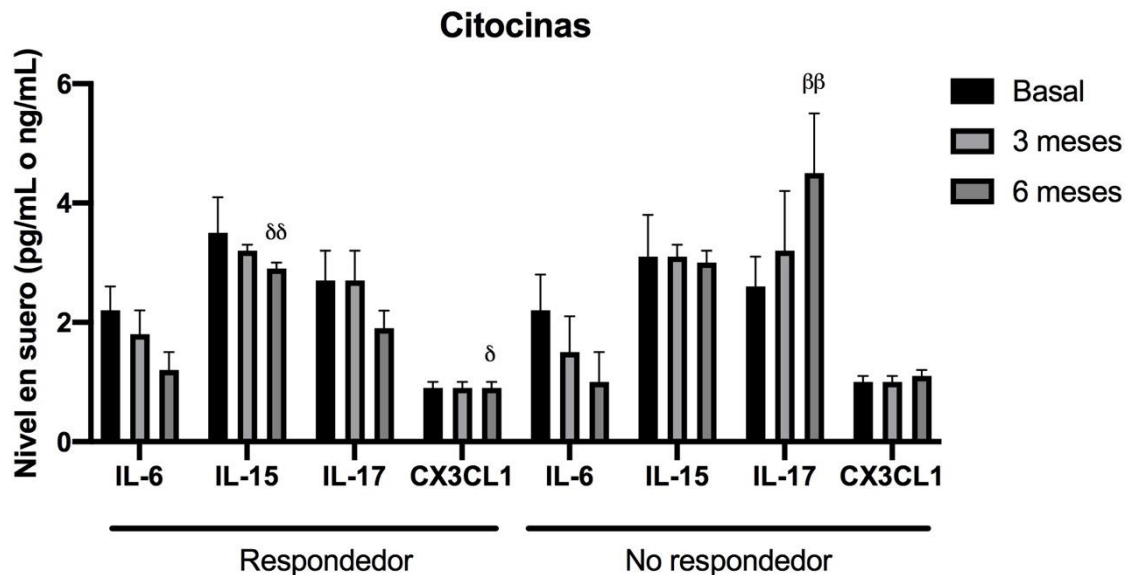
Los valores se expresan como media (EEM) en pg/mL para todas excepto CX3CL1 en ng/mL.  
<sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001); <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).

**Abreviaturas:** Resp: respondedor.



**Figura 56.** Niveles de citocinas (media  $\pm$  EEM) en pg/mL en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.

<sup>a</sup>significación estadística vs basal (<sup>c</sup>p<0,05; <sup>cc</sup>p<0,01; <sup>ccc</sup>p<0,001). <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).



**Figura 57.** Niveles de citocinas (media  $\pm$  EEM) en pg/mL para IL-6, IL-15 e IL-17 y en ng/mL para CX3CL1 en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.

<sup>a</sup>significación estadística vs basal (<sup>c</sup>p<0,05; <sup>cc</sup>p<0,01; <sup>ccc</sup>p<0,001). <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).

En cuanto a los factores de transcripción, los niveles de expresión del gen AHR se normalizaron tanto en el grupo de pacientes respondedores como no respondedores con la administración de rifaximina (Tabla 38, Figura 58).

La expresión del gen TBX21 que estaba aumentada en pacientes con EHM, no se vio modificada por el tratamiento en ninguno de los grupos de respuesta terapéutica (Tabla 38, Figura 58).

Los pacientes respondedores al tratamiento, al contrario que los pacientes no respondedores, presentaron un aumento en la expresión del gen GATA3 (Tabla 38, Figura 58).

El tratamiento con rifaximina redujo los niveles de expresión del factor de transcripción RORC de manera similar en ambos grupos de respuesta terapéutica (Tabla 38, Figura 58).

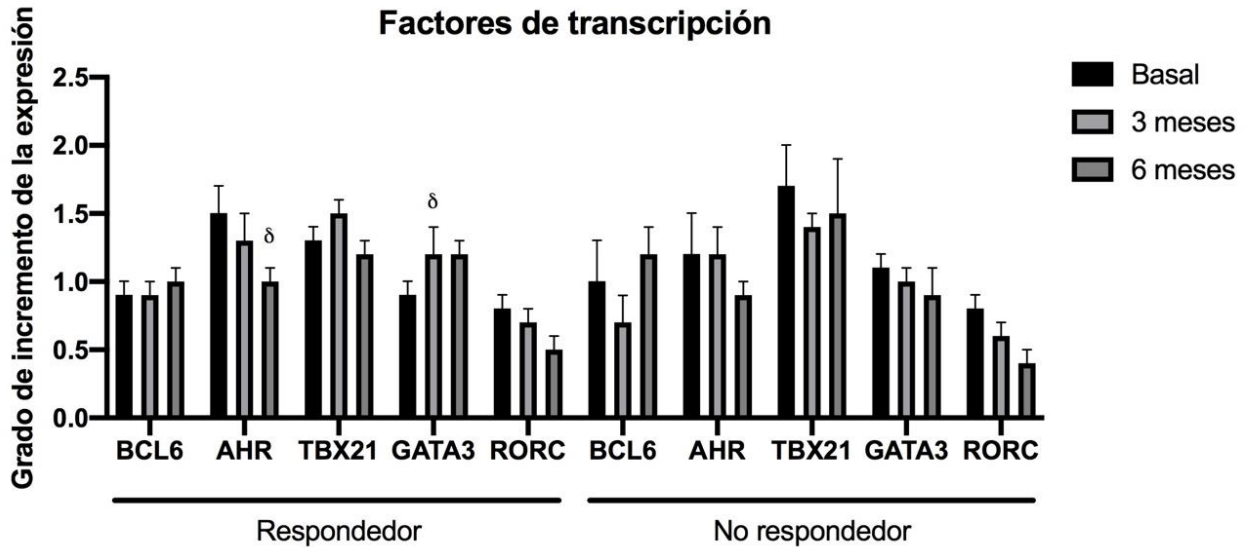
**Tabla 38.** Factores de transcripción en los grupos de respuesta a la rifaximina al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.

Factores de transcripción	Basal		3 meses		6 meses	
	Resp (n=21)	No resp (n=11)	Resp (n=21)	No resp (n=11)	Resp (n=19)	No resp (n=9)
<b>BCL6</b>	0,9 (0,1)	1,0 (0,3)	0,9 (0,1)	0,7 (0,2)	1,0 (0,1)	1,2 (0,2)
<b>AHR</b>	1,5 (0,2)	1,2 (0,3)	1,3 (0,2)	1,2 (0,2)	1,0 (0,1) <sup>o</sup>	0,9 (0,1)
<b>TBX21</b>	1,3 (0,1)	1,7 (0,3)	1,5 (0,1)	1,4 (0,1)	1,2 (0,1)	1,5 (0,4)
<b>GATA3</b>	0,9 (0,1)	1,1 (0,1)	1,2 (0,2) <sup>o</sup>	1,0 (0,1)	1,2 (0,1)	0,9 (0,2)
<b>RORC</b>	0,8 (0,1)	0,8 (0,1)	0,7 (0,1)	0,6 (0,1)	0,5 (0,1)	0,4 (0,1)

Los valores se expresan como media (EEM).

<sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001); <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).

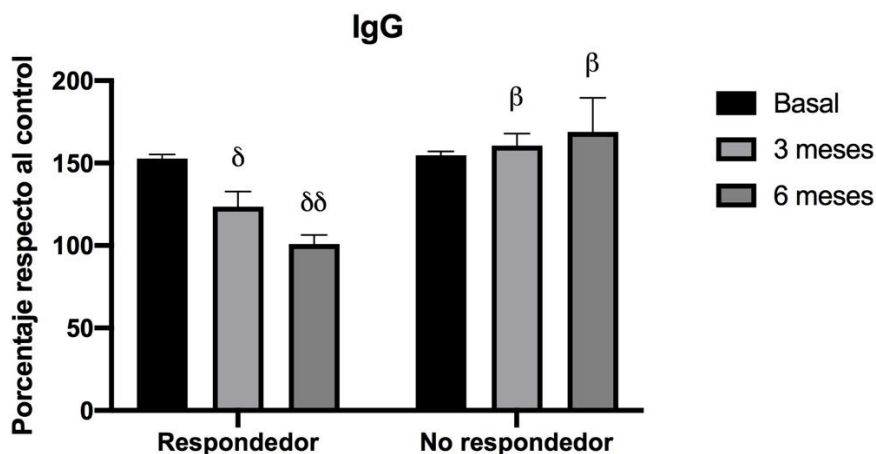
**Abreviaturas:** Resp: respondedor.



**Figura 58.** Grado de incremento en la expresión de los factores de transcripción (media  $\pm$  EEM) relativa a los controles al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses en ambos grupos de respuesta.

$\delta$ significación estadística vs basal ( $\delta$ p<0,05;  $\delta\delta$ p<0,01;  $\delta\delta\delta$ p<0,001).  $\beta$ significación estadística vs respondedor ( $\beta$ p<0,05;  $\beta\beta$ p<0,01;  $\beta\beta\beta$ p<0,001).

Los grupos de pacientes respondedores y no respondedores presentaron niveles de IgG en plasma similares al inicio del tratamiento (media 153% vs 155% respectivamente; diferencia de las medias de 2, IC95=-6-10, p=0,588). Los pacientes respondedores mostraron una reducción significativa de los niveles a los 3 y 6 meses del tratamiento con diferencias respecto a los pacientes no respondedores (Figura 59).



**Figura 59.** Porcentaje de variación en los niveles de IgG (media  $\pm$  EEM) respecto a los controles al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses en ambos grupos de respuesta.

$\delta$ significación estadística vs basal ( $\delta$ p<0,05;  $\delta\delta$ p<0,01;  $\delta\delta\delta$ p<0,001).  $\beta$ significación estadística vs respondedor ( $\beta$ p<0,05;  $\beta\beta$ p<0,01;  $\beta\beta\beta$ p<0,001).





## **VII. DISCUSIÓN**



## 1. GENERALIDADES

La EHM es un síndrome neuropsiquiátrico complejo presente en una gran proporción de pacientes con cirrosis hepática (50-53) y supone un grave problema de salud, social y económico (69-72). Este estudio se ha centrado en dos puntos clave de la misma: (I) el **diagnóstico** mediante la caracterización de sus alteraciones neurológicas más frecuentes, el análisis de los parámetros inflamatorios implicados en su patogenia y el estudio de la utilidad diagnóstica de los diferentes test psicométricos y bioquímicos; y (II) el **tratamiento** con rifaximina a través del análisis de su efecto sobre las alteraciones neurológicas e inflamatorias características de pacientes con EHM y la identificación del subgrupo de pacientes beneficiarios de su administración.

## 2. FACTORES CLÍNICOS Y ANALÍTICOS

Es bien conocido que la prevalencia de la EHM aumenta con algunos factores de riesgo como la edad, el consumo crónico de alcohol, la colocación de un TIPS o la presencia de varices esofágicas (51). En nuestro estudio, el análisis de los factores clínicos y analíticos determinó que, acorde a las características basales, los distintos grupos del estudio eran comparables y permitió establecer factores relacionados con la aparición de EHM.

Cabe destacar, que los pacientes con cirrosis hepática y los controles incluidos en el estudio no presentaron diferencias de edad que pudieran implicar alteraciones neurológicas típicas de la senectud (239). Asimismo, el diagnóstico de EHM se estableció mediante el PHES ajustado tanto a la edad como al nivel de estudios (230).

En cuanto al sexo, se incluyeron más mujeres en el grupo de controles que en el de pacientes sin diferencias entre los grupos con y sin EHM. Si bien algunos estudios han observado diferencias en la función y composición de la microbiota intestinal entre hombres y mujeres (240), éstas no se han relacionado con el riesgo de EHM ni con la respuesta al tratamiento en la literatura ni en nuestro trabajo.

Algunas comorbilidades como la DM y la resistencia a la insulina se caracterizan por liberar citocinas proinflamatorias y contribuir al desarrollo de EH (241). Este resultado no se confirmó para el caso de la EHM diagnosticada por el PHES donde ni la DM ni otros factores de riesgo cardiovascular, por si solos, supusieron un factor de riesgo.

Por otro lado, el riñón es un órgano importante para la eliminación de sustancias neurotóxicas de la circulación. Se ha observado un aumento en la mortalidad en pacientes con cirrosis y EH que presentan deterioro de la función renal, especialmente en los casos de fallo renal agudo y SHR (242). Sin embargo, no se conoce el efecto del deterioro de la función renal sobre la probabilidad de desarrollo de EHM. En nuestro estudio, no se observó un mayor riesgo de EHM entre pacientes con enfermedad renal crónica o episodios previos de SHR. Si bien es cierto que se consideró el SHR en algún momento a lo largo de la evolución de la cirrosis previo al inicio del estudio y no se recogieron episodios de fallo renal agudo por otras causas, lo cual no permite establecer una relación causal directa con la EHM.

El consumo crónico de alcohol da como resultado múltiples disfunciones del SNC y periférico. Algunas se deben a la acción directa del alcohol o sus derivados y otras son inducidas por las deficiencias vitamínicas asociadas (243). Para evitar este factor de confusión, únicamente se incluyeron pacientes con más de 6 meses de abstinencia que no presentaran ninguna alteración neurológica y psiquiátrica relacionada con el alcohol.

En cuanto a la etiología de la cirrosis, los pacientes con infección crónica por el VHC presentaron un riesgo reducido de EHM. Esto puede ser debido a la gran disponibilidad y eficacia de los tratamientos antivirales de acción directa y su efecto beneficioso sobre la disfunción hepatocelular y la HTP (244). Esto concuerda con que la EHGNA y otras etiologías con tratamientos menos eficaces, aunque de forma no significativa, se relacionaron con un mayor riesgo de EHM.

La sobredosificación de diuréticos y las alteraciones hidroelectrolíticas son factores precipitantes de EH bien establecidos (56-57). Los resultados de nuestro estudio confirmaron que los pacientes en tratamiento de mantenimiento con diuréticos, tanto con furosemida como con espironolactona, presentan un riesgo de EHM entre 3,6 y 3,9 veces

superior a los pacientes sin este tratamiento. Por ello, en pacientes con sospecha y/o diagnóstico de EHM conviene ser estrictos en la indicación del tratamiento diurético.

Sorprendentemente, siendo uno de los tratamientos de primera línea (133), la lactulosa no se asoció con un menor riesgo de EHM. Esto puede ser debido a que la principal indicación de la lactulosa fue por estreñimiento crónico, el cual a su vez, supone un factor de riesgo de EH (56).

Ha sido demostrado ampliamente que las complicaciones de la cirrosis también predisponen a la aparición de EH (56-57). Los pacientes con infecciones o episodios de hemorragia digestiva recientes fueron excluidos de nuestro estudio con la intención de evitar el efecto directo de estas complicaciones sobre las alteraciones neurológicas e inmunitarias. Aún así, los pacientes con cirrosis descompensada mostraron un riesgo de EHM 5,3 veces superior al de pacientes sin ninguna descompensación previa, especialmente en los casos de ascitis o PBE.

Considerando el grado de función hepática, éste no se relacionó significativamente con el riesgo de EHM. No obstante, de acuerdo con lo descrito previamente (245), la proporción de pacientes con EHM pasó del 46% al 66% en pacientes con Child-Pugh clase A y C, respectivamente.

Respecto a los parámetros analíticos, como era de esperar, los pacientes con cirrosis hepática presentaron alteraciones en las enzimas y pruebas de función hepática y en los niveles de plaquetas. Además, presentaron niveles más bajos de hemoglobina que los controles, en probable relación con pérdidas crónicas por gastropatía de la HTP (246); y de colesterol, atribuido a la alteración en el metabolismo de los lípidos típica de pacientes con cirrosis (247-248).

Se observó una correlación positiva entre el PHES y los niveles de sodio y plaquetas, de manera que a mayor gravedad de la hiponatremia y la plaquetopenia, posiblemente como reflejo del grado de disfunción circulatoria e HTP (39-40), peor ejecución en el test.

### **3. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS**

Se decidió utilizar la batería PHES para la clasificación de los pacientes en los grupos con y sin EHM dado que está considerado el “gold standard” al evaluar diferentes funciones neurológicas entre las que se incluyen la memoria de trabajo con el TSD, la velocidad de procesamiento y la atención selectiva con los TCN-A y B y la coordinación visuoespacial con el TPS y el TLQ (91), además de que ha sido validado en España (231).

La velocidad del procesamiento mental y la atención selectiva también fueron evaluadas mediante los test de Stroop y de claves oral. El test de Stroop tiene como ventaja que únicamente requiere reconocer palabras y colores y no exige una alta capacidad intelectual, se ajusta por edad y su realización es rápida. Tiene la limitación de que pacientes con dificultades para identificar colores (por ejemplo en el daltonismo) pueden ver interferidos los resultados (233-234). El test de claves oral no presenta esta limitación y también es rápido de realizar (236). Ambos grupos de pacientes presentaron déficits neurológicos respecto a los controles, más marcados en el caso de los pacientes catalogados como con EHM por el PHES. Estas alteraciones son típicas de pacientes con espectro autista, demencias o esquizofrenia y pueden condicionar el funcionamiento cognitivo global con dificultades para la resolución de problemas de la vida diaria, la permanencia en el trabajo y las habilidades sociales (249). No obstante, el hecho de que pacientes sin EHM presentaran alteraciones en la velocidad de procesamiento y en la atención selectiva indica que también son trastornos neurológicos tempranos y frecuentes en la cirrosis hepática. Ambos test mostraron una buena correlación con el PHES y una elevada capacidad diagnóstica por lo que se podrían utilizar en lugar de la batería PHES para evitar el efecto aprendizaje en pruebas repetidas. Además, la tarea congruente del test de Stroop podría ser utilizada por si sola en la práctica clínica como prueba rápida de cribado del deterioro neurológico con una sensibilidad cercana al 90%.

El test d2 analiza la capacidad para fijar la atención en una actividad y realizarla de forma ágil y con precisión (235). Ambos grupos de pacientes con cirrosis presentaron alteraciones en estas capacidades cognitivas al ser comparados con los controles, nuevamente más marcadas en el grupo con EHM. Esto supone un detrimento en la calidad de vida de los pacientes que pueden ver limitadas actividades básicas como la conducción

de vehículos (70-71). Al igual que la tarea congruente del test de Stroop, el número de aciertos totales en el test d2 podría ser utilizado en la consulta para el cribado de pacientes con alteraciones neurológicas con una especificidad superior al anterior.

Los pacientes con cirrosis, y sobre todo con EHM, presentaron déficits en la memoria de trabajo. Ésta se encarga del almacenamiento y manipulación temporal de la información para la realización de tareas cognitivas complejas como la lectura o los cálculos matemáticos (250). Es por ello que pacientes con cirrosis hepática pueden ver afectadas estas capacidades y aquejar olvidos frecuentes.

Al igual que en el caso de las alteraciones cognitivas, ambos grupos de pacientes con cirrosis hepática, presentaron alteraciones motoras, más marcadas en el caso de pacientes clasificados como con EHM por el PHES. Esto supone un enlentecimiento motor y un mayor riesgo de padecer accidentes domésticos y laborales (71).

Los parámetros clínicos relacionados con las alteraciones neurológicas detectadas en los distintos test psicométricos específicos, fueron aquellos relacionados con la disfunción cardiocirculatoria típica de la cirrosis (39-40), al igual que los asociados a la EHM diagnosticada por el PHES. Además, en este caso, y tal como se ha descrito previamente en la literatura (251), los pacientes con DM y/o tratamiento con metformina presentaron alteraciones cognitivas en forma de tendencia con una peor capacidad de concentración en el test d2.

De este modo, los pacientes con EHM diagnosticados por el PHES, presentaron alteraciones en las distintas esferas cognitivas y motoras. Estas alteraciones, aunque de forma más leve, estuvieron presentes en una gran proporción de pacientes con cirrosis hepática categorizados como sin EHM, indicando que son alteraciones tempranas y frecuentes en la cirrosis. Así pues, se recomienda la utilización de otros test psicométricos específicos, sencillos, objetivos y fiables, que permitan diagnosticar aquellos pacientes con alteraciones infraestimadas por el PHES, sobre todo en pacientes con factores de riesgo de EHM.

#### **4. NIVELES DE AMONIO EN SANGRE**

La hiperamonemia se considera uno de los principales mecanismos implicados en el desarrollo de la EHM (93). El resultado de nuestro estudio confirmó que, respecto a pacientes sin EHM, los pacientes con EHM presentaban niveles superiores de amonio en sangre. No obstante, estos niveles presentaron una correlación moderada negativa con el PHES. Los pacientes con cirrosis sin EHM también presentaron niveles significativamente más elevados que los controles pero manteniendo unos valores dentro del rango de normalidad (237) y probablemente sin tanta repercusión a nivel cerebral.

La disfunción hepatocelular y el desarrollo de colaterales portosistémicas dan lugar al aumento de los niveles de amonio en pacientes con cirrosis (95). Es por ello que en los pacientes de nuestro estudio los niveles de amonio en sangre se asociaron con niveles inferiores de albúmina como reflejo de la disfunción hepática y con parámetros de disfunción circulatoria e HTP como la presencia de plaquetopenia, ascitis y necesidad de diuréticos.



## 5. ALTERACIONES INMUNITARIAS

El síndrome de disfunción inmunitaria asociada a la cirrosis implica un deterioro del sistema inmunitario y un estado de inflamación mantenida (220) que, de forma sinérgica con el aumento de los niveles de amonio, contribuye al desarrollo de la EH (221). En el caso de la EHM, se asume que el mecanismo patogénico es similar, sin embargo, esta teoría no está bien demostrada.

Centrándonos en el estudio de la respuesta inmunitaria, los pacientes con cirrosis hepática, y de forma más marcada aquellos con EHM, presentaron una activación de la inmunidad innata demostrada por un aumento en el porcentaje de monocitos intermedios proinflamatorios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>). Estos monocitos son productores de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 y CCL20 y precursores de los macrófagos M1, también con fenotipo inflamatorio (186-188). A su vez, los monocitos y macrófagos actúan como células presentadoras de antígeno contribuyendo a la activación linfocitaria (171).

De forma similar, los pacientes con EHM presentaron una expansión de linfocitos T autorreactivos (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) 2 veces superior a los pacientes sin EHM y 2,5 veces superior a los controles. Esta población de linfocitos CD4 puede secretar grandes cantidades de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  promoviendo un ambiente proinflamatorio (175-176). Además, se ha visto aumentada en procesos de envejecimiento y es considerada un marcador de inmunosenescencia (252-253). De este modo, el incremento en el porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> observado en pacientes con EHM estaría reflejando una inmunosenescencia temprana que podría ser utilizada como biomarcador para el diagnóstico de la EHM.

A diferencia de los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, los linfocitos T autorreactivos presentan en su membrana el receptor CX3CR1 que, junto con su ligando CX3CL1 expresado en células endoteliales, facilita la quimioatracción y migración de las células al cerebro en enfermedades como la esclerosis múltiple (177). De este modo, la migración de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> al cerebro podría contribuir a la aparición de las alteraciones neurológicas típicas de los pacientes con EHM.

Otra alteración inmunitaria observada en los pacientes con EHM, no presente en pacientes sin EHM, fue el incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4 activados, tanto de la población de linfocitos T autorreactivos como no autorreactivos. Este incremento indicaría una activación persistente de los linfocitos T que contribuiría a la disfunción inmunitaria mediante la alteración en el patrón de citocinas, en la diferenciación a los subtipos de linfocitos CD4 y en la infiltración tisular (190-191).

Con el estudio de citocinas en suero se confirmó el estado proinflamatorio típico de la cirrosis (220-221) de modo que, los pacientes con cirrosis hepática sin EHM presentaron un aumento en los niveles de IL-6, IL-18, IL-15, IL-17, IL-21, CXCL13, CX3CL1 y el CCL20; siendo éste aumento más marcado en pacientes con EHM. Los pacientes con EHM asociaron un incremento en los niveles de IL-22 no presente en los pacientes sin EHM, sugiriendo que el aumento de esta interleucina se produce en estadios más avanzados de la EHM. Además, la IL-6, IL-17, IL-22, CXCL13, CX3CL1 y CCL20 correlacionaron negativamente con el PHES, indicando que, de acuerdo a lo presentado previamente por nuestro grupo (127), a mayor grado de inflamación, mayor deterioro neurológico.

Como dato a destacar, la IL-22 presentó una precisión para el diagnóstico de EHM superior al 85%. Esta citocina se vio elevada en pacientes que habían presentado algún episodio de ascitis y/o PBE, incluyendo aquellos que tomaban norfloxacino como profilaxis. De este modo, el aumento de riesgo de EHM asociado a estas descompensaciones, probablemente está mediado por el aumento en los niveles de esta citocina. Al mismo tiempo, se vio una relación significativa entre los niveles de IL-22 y amonio, de manera que pacientes con niveles superiores de IL-22 presentaban, a su vez, niveles superiores de amonio, lo cual confirma la sinergia de ambos factores en el desarrollo de la EHM (221, 128) con un mayor peso del factor inflamatorio de acuerdo a los resultados del análisis multivariante.

Centrándonos en los factores de transcripción, los pacientes con EHM, a diferencia de pacientes sin EHM y controles, presentaron un aumento en la diferenciación de linfocitos T CD4 hacia linfocitos Th22. Estos se caracterizan por la liberación de IL-22 y TNF $\alpha$  y están implicados en la patogénesis de las alteraciones neurológicas típicas de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (254). Así pues, la expansión de

esta subpoblación también podría contribuir al desarrollo de las alteraciones neurológicas de los pacientes con EHM.

Paralelamente, la respuesta humoral juega un papel importante en el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (255) y probablemente en la EHM. Esto viene apoyado por el aumento en la activación de los linfocitos B en pacientes con EHM, demostrada mediante la determinación de los niveles de IgG.

## **6. EVOLUCIÓN CLÍNICA Y ANALÍTICA**

Ha sido descrito en estudios anteriores que la EHM predispone al desarrollo de EHC, empeora el pronóstico de la enfermedad y reduce la supervivencia (55). En el caso de nuestro estudio, aquellos pacientes con EHM presentaron un riesgo de desarrollo de EHC 5 veces superior a los pacientes sin EHM, con un menor tiempo de evolución de la enfermedad hasta la aparición del primer episodio y una probabilidad acumulada de hasta el 50% a los 5 años, respecto a un 7% en el grupo de pacientes sin EHM. En cuanto a la supervivencia, a partir del segundo año de seguimiento se observó en las curvas de Kaplan-Meier una caída más marcada en el grupo de pacientes con EHM sin diferencias significativas. No obstante, hay que ser cautos a la hora de interpretar estos resultados dado que el grupo de pacientes con EHM recibió tratamiento con rifaximina, la cual podría haber influido en la evolución natural de la enfermedad, e incluso, mejorar el pronóstico de estos pacientes.

## **7. TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA**

Se administró tratamiento con rifaximina a todos los pacientes con EHM diagnosticada por el PHES y se reevaluó la respuesta a los 3, 6 y 12 meses. Se observó una eficacia a los 3 meses del 66%, similar a la descrita previamente (168-169). Ninguno de los pacientes no respondedores a los 3 meses, mejoró el PHES a los 6 ni a los 12 meses a pesar de mantener el tratamiento. De esto se puede deducir que la rifaximina presenta un efecto rápido y no se obtiene beneficio al prolongarla en aquellos pacientes sin respuesta a los 3 meses. El fármaco fue, en general, bien tolerado con una tasa de efectos secundarios del 14% y de retirada del 9%. Se observó una buena tasa de adherencia con una clara relación entre la adherencia y la respuesta al fármaco. Considerando únicamente aquellos pacientes adherentes al tratamiento, la eficacia aumentó hasta un 78%, por lo que se considera necesario indagar en este aspecto al evaluar la respuesta terapéutica.

En cuanto al impacto del tratamiento en la evolución clínica, la rifaximina ha demostrado un beneficio en la reducción de la recurrencia de la EH, en la tasa de hospitalizaciones y en la mortalidad en pacientes con EHC (145-146). No obstante, el efecto del tratamiento sobre la evolución clínica de pacientes con EHM no está bien establecido. En nuestro estudio, esto no pudo ser evaluado correctamente dado que no se incluyó un grupo placebo de pacientes con EHM. Aún así, no se encontraron diferencias entre los grupos de pacientes respondedores y no respondedores en cuanto a la aparición de EHC u otras complicaciones de la cirrosis ni en la supervivencia global.

Sí que se ha descrito una mejoría de las alteraciones neurológicas y de la calidad de vida con la administración de rifaximina en pacientes con EHM (167). De forma similar, se objetivó una mejoría progresiva de las alteraciones cognitivas y motoras en el grupo de pacientes respondedores al tratamiento. Estos presentaron un beneficio fundamentalmente en la velocidad del procesamiento mental, en la atención selectiva y sostenida y en la coordinación. La memoria de trabajo mostró una respuesta más sutil a la rifaximina, por lo que pacientes con EHM probablemente mantengan ciertas limitaciones en el almacenamiento y elaboración de la información a pesar del tratamiento. El grupo de pacientes no respondedores no solo no mostró mejoría en la flexibilidad cognitiva evaluada por el test de Stroop, sino que la empeoró y aunque sí que

mejoró en el resto de test psicométricos, no lo hizo al nivel del grupo de pacientes respondedores.

La rifaximina es un antibiótico oral con una absorción sistémica baja que actúa modulando la composición y función de las bacterias del tracto gastrointestinal reduciendo los niveles de amonio (138). En el caso de nuestro estudio, la reducción de los niveles de amonio sucedió únicamente en el grupo de pacientes respondedores aunque de forma no significativa. Esto hace pensar que, si bien la reducción de amonio es importante para revertir la EHM, la rifaximina ejerce su efecto principalmente modulando los cambios inflamatorios asociados a esta entidad.

Esta teoría se apoya con el hecho de que el grupo de pacientes respondedores presentó una normalización de prácticamente todas las alteraciones presentes en el inmunofenotipo, en los niveles de citocinas en sangre y en los factores de transcripción, mientras que los pacientes no respondedores, únicamente mejoraron algunas de estas alteraciones. Los parámetros que mejoraron en todos los pacientes fueron el porcentaje de monocitos clásicos, los niveles de IL-6 e IL-15 y la expresión del factor de transcripción AHR, probablemente indicando que la restauración de estas alteraciones no es suficiente para revertir la EHM una vez está presente. Los parámetros que mejoraron de forma selectiva en pacientes respondedores fueron el porcentaje de monocitos intermedios, linfocitos T autorreactivos y no autorreactivos, linfocitos T activados, los niveles de IL-17, IL-21, IL-22, CXCL13 y de IgG, lo cual sugiere que para obtener una respuesta terapéutica es necesario revertir estas alteraciones.

A la hora de evaluar factores relacionados con la respuesta al tratamiento la edad parece influir dado que por si misma se asocia a alteraciones cognitivas (239) y por tanto, a una menor respuesta al tratamiento. Es por ello, que instaurar el tratamiento de forma precoz puede aportar beneficios. Otro hallazgo interesante del estudio fue encontrar una peor respuesta al tratamiento en pacientes con un perfil metabólico alterado (síndrome metabólico, HTA, DM, glucemia alterada en ayunas, tratamiento con metformina y/o EHGNA). Algunos estudios han demostrado que pacientes con DM o esteatohepatitis no alcohólica sin cirrosis presentan deterioro cognitivo leve asociado a ciertos niveles de inflamación (241, 251) lo cual podría a su vez influir en la respuesta terapéutica. De este

modo, en este subgrupo de pacientes será necesario tratar las alteraciones metabólicas de forma concomitante para obtener una mejor respuesta a la rifaximina.

Analizando las posibles alteraciones inmunitarias relacionadas con la respuesta terapéutica, el grupo de pacientes no respondedores no presentaba un aumento en el porcentaje de linfocitos T activados al inicio del tratamiento. Dado que el CD69 es un marcador de activación temprana (190-191), podría suceder que pacientes no respondedores se encuentren en una fase de activación más avanzada donde el marcador deja de expresarse y donde la rifaximina no es capaz de revertir las alteraciones inmunitarias. Así pues, el CD69 podría ser utilizado como biomarcador para decidir qué grupo de pacientes se beneficiaría del tratamiento con rifaximina.

Por tanto, las alteraciones en el sistema inmunitario podrían ser diferentes en función de las características del paciente de modo que pacientes que responden se encuentran en una etapa donde los cambios inflamatorios todavía pueden ser revertidos por la rifaximina, mientras que pacientes no respondedores se encuentran en una etapa más avanzada e irreversible de la inflamación o presentan factores concomitantes que no permiten a la rifaximina restaurar las alteraciones inflamatorias. En este sentido, se necesitarían más estudios que permitieran caracterizar en detalle los cambios inmunológicos asociados a las alteraciones neurológicas de pacientes con EHM, sobre todo en el subgrupo de pacientes no respondedores a la rifaximina, y facilitarían el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que mejorarán la tasa de respuesta.

## **VIII. CONCLUSIONES**





1. El riesgo de EHM diagnosticada por el PHES se relaciona con los parámetros clínicos y biológicos de disfunción circulatoria de la cirrosis hepática.
2. La batería de test psicométricos específicos podría detectar alteraciones cognitivas infraestimadas por el PHES, especialmente en pacientes con factores de riesgo y evitar el proceso de aprendizaje de las pruebas repetidas.
3. Los niveles de amonio en sangre no presentan una buena correlación con las alteraciones neurológicas ni son, por si solos, una buena herramienta para el diagnóstico de EHM.
4. Los pacientes con EHM determinada por el PHES muestran una alteración importante de la actividad inflamatoria expresada fundamentalmente por aumento en los niveles de linfocitos T autorreactivos y activados, la IL-22, el factor AHR y los niveles de IgG.
5. La rifaximina es capaz de modificar en un porcentaje importante de pacientes, especialmente aquellos adherentes, las alteraciones neurológicas e inflamatorias de la EHM.
6. La presencia de alteraciones metabólicas y la ausencia de un patrón inflamatorio con predominio de linfocitos T activados, podría condicionar una peor respuesta a la rifaximina.



## **IX. BIBLIOGRAFIA**



1. Jameson JL, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Loscalzo J. Harrison. Principios de Medicina Interna. 20<sup>a</sup> ed. Madrid: McGraw-Hill; 2019.
2. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*, 2014 May 17;383(9930):1749–61.
3. Scaglione S, Kliethermes S, Cao G, Shoham D, Durazo R, Luke A, et al. The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study. *J. Clin Gastroenterol*, 2015 Sep;49(8):690-6.
4. Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, Corbould E, Lazarus JV, Webber L, et al; EASL HEPAHEALTH Steering Committee. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol*, 2018 Sep;69(3):718-735.
5. Institute for Health Metrics and Evaluation. The Global Burden of Disease Study 2017 [Internet]. Published 2018; Cited: may 2019. Available from: <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>.
6. World Health Organization Regional Office for Europe. European Mortality Database [Internet]. Copenhagen: Division of Information, Evidence, Research and Innovation; 1980-2020 [Updated: 07 September 2020; Cited: 21 diciembre 2020]. Available from: [http://www.who.int/healthinfo/mortality\\_data/en/](http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/)
7. Instituto Nacional de Estadística. Estadística de defunciones según la causa de muerte [Internet]. Madrid: INE; 2020 [actualizado: 17 diciembre 2020; citado: 21 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.ine.es/index.htm>
8. Naveau S, Perlemuter G, Balian A. Epidemiology and natural history of cirrhosis. *Rev Prat*, 2005 Sep 30;55(14):1527-32.
9. Di Bisceglie AM. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatol*, 2000 Apr;31(4):1014-8.
10. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*, 2015 Mar;148(3):547-55.
11. Lazo M, Hernaez R, Bonekamp S, Kamel IR, Brancati FL, Guallar E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *BMJ*, 2011 Nov 18;343:d6891.

12. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*, 2006 Oct;44(4):865-73.
13. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004 Mar 11;350(11):1118-29.
14. Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis. *Lancet*, 2011 May 7;377(9777):1600-9.
15. Poupon R, Chazouilleres O, Corpechot C, Chrétien Y. Development of autoimmune hepatitis in patients with typical primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 2006 Jul;44(1):85-90.
16. Camaschella C. Treating iron overload. *N Engl J Med*, 2013 Jun 13;368(24):2325-7.
17. Dowling D. Screening for Wilson's disease in acute liver failure: a comparison of currently available diagnostic tests. *Hepatology*, 2009 Jul;50(1):329.
18. Smith A, Baumgartner K, Bositis C. Cirrhosis: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2019 Dec 15;100(12):759-770.
19. Simonetto DA, Liu M, Kamath PS. Portal Hypertension and Related Complications: Diagnosis and Management. *Mayo Clin Proc*, 2019 Apr;94(4):714–26.
20. Ellis G, Goldberg DM, Spooner RJ, Ward AM. Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. *Am J Clin Pathol*, 1978 Aug;70(2):248-58.
21. Ballard HS. The hematological complications of alcoholism. *Alcohol Health Res World*, 1997;21(1):42-52.
22. Tanaka S, Okamoto Y, Yamazaki M, Mitani N, Nakajima Y, Fukui H. Significance of hyperglobulinemia in severe chronic liver diseases--with special reference to the correlation between serum globulin/IgG level and ICG clearance. *Hepatogastroenterology*, 2007 Dec;54(80):2301-5.
23. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg*, 1964;1:1-85.
24. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*, 2000 Apr;31(4):864-71.
25. Giorgio A, Amoroso P, Lettieri G, Fico P, de Stefano G, Finelli L, et al. Cirrhosis: value of caudate to right lobe ratio in diagnosis with US. *Radiology*, 1986 Nov;161(2):443-5.
26. Burrel M, Llovet JM, Ayuso C, Iglesias C, Sala M, Miquel R, et al, Barcelona Clinic Liver Cancer Group. MRI angiography is superior to helical CT for detection of HCC

- prior to liver transplantation: an explant correlation. *Hepatology*, 2003 Oct;38(4):1034-42.
27. Bonkovsky HL, Rubin RB, Cable EE, Davidoff A, Rijcken TH, Stark DD. Hepatic iron concentration: noninvasive estimation by means of MR imaging techniques. *Radiology*, 1999 Jul;212(1):227-34.
  28. Qayyum A, Goh JS, Kakar S, Yeh BM, Merriman RB, Coakley FV. Accuracy of liver fat quantification at MR imaging: comparison of out-of-phase gradient-echo and fat-saturated fast spin-echo techniques—initial experience. *Radiology*, 2005 Nov;237(2):507-11.
  29. Brenner S. Transient Elastography for Assessment of Liver Fibrosis and Steatosis: An Evidence-Based Analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*, 2015 Nov 1;15(18):1–45.
  30. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol*, 2008 May;48(5):835–47.
  31. Pang JX, Pradhan F, Zimmer S, Niu S, Crotty P, Tracey J, et al. The feasibility and reliability of transient elastography using Fibroscan®: A practice audit of 2335 examinations. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2014 Mar;28(3):143–9.
  32. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 2014 Jun 21;20(23):7312-24.
  33. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol*, 2002 Aug 23;1(1):1.
  34. De Zanger R, Wisse E. The filtration effect of rat liver fenestrated sinusoidal endothelium on the passage of (remnant) chylomicrons to the space of Disse. In: Knook DL, Wisse E, editor. *Sinusoidal Liver Cells*. Amsterdam, Elsevier; 1982. pp. 69–76.
  35. Deaciuc IV, D'Souza NB, Fortunato F, Hill DB, Sarphe TG, McClain CJ. Alcohol-induced sinusoidal endothelial cell dysfunction in the mouse is associated with exacerbated liver apoptosis and can be reversed by caspase inhibition. *Hepatol Res*, 2001 Jan 1;19(1):85-97.
  36. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*, 2006 Dec 14;12(46):7413-20.
  37. Kim MY, Baik SK, Lee SS. Hemodynamic alterations in cirrhosis and portal hypertension. *Korean J Hepatol*, 2010 Dec;16(4):347-52.
  38. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*, 2009;50(3):604-20.

39. Kim MY, Baik SK. Hyperdynamic circulation in patients with liver cirrhosis and portal hypertension. *Korean J Gastroenterol*, 2009 Sep;54(3):143-8.
40. Feldman M, Friedman L, Brandt L. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 11th ed. Philadelphia. Elsevier; 2020.
41. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Córdoba J, Ferenci P, Mullen K, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*, 2014 Aug;60(2):715-35.
42. Bajaj JS, Wade JB, Sanyal AJ. Spectrum of neurocognitive impairment in cirrhosis: Implications for the assessment of hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 2009 Dec;50(6):2014-21.
43. Allampati S, Mullen K. Nomenclature and definition of hepatic encephalopathy—An update. *Clin Liver Dis*, 2015 Apr 21;5(3):68-70.
44. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*, 2002 Mar;35(3):716-21.
45. Bajaj JS. Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010 Mar; 31(5):537-47.
46. Jepsen P, Ott P, Andersen PK, Sorensen HT, Vilstrup H. Clinical course of alcoholic liver cirrhosis: a Danish population-based cohort study. *Hepatology*, 2010 May;51(5):1675-82.
47. Patidar KR, Bajaj JS. Covert and Overt Hepatic Encephalopathy: Diagnosis and Management. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2015 Nov;13(12):2048-61.
48. Casadaban LC, Parvinian A, Minocha J, Lakhoo J, Grant CW, Ray CE Jr, et al. Clearing the Confusion over Hepatic Encephalopathy After TIPS Creation: Incidence, Prognostic Factors, and Clinical Outcomes. *Dig Dis Sci*, 2015 Apr; 60(4):1059-66.
49. Fonio P, Discalzi A, Calandri M, Doriguzzi Breatta A, Bergamasco L, Martini S, et al. Incidence of hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) according to its severity and temporal grading classification. *Radiol Med*, 2017 Sep; 122(9):713-721.
50. Goyal O, Sidhu S, Kishore H. Incidence, prevalence and natural history of minimal hepatic encephalopathy in cirrhosis. *J Hepatol*, 2016;64(2):S279.



51. Groeneweg M, Moerland W, Quero JC, Krabbe PF, Schalm SW. Screening of subclinical hepatic encephalopathy. *J Hepatol*, 2000 May;32(5):748-53.
52. Sharma P, Sharma BC, Puri V, Sarin SK. Critical flicker frequency: diagnostic tool for minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol*, 2007 Jul;47(1):67-73.
53. Wang J, Zhang N, Chi B, Mi Y, Meng L, Liu Y, et al. Prevalence of minimal hepatic encephalopathy and quality of life evaluations in hospitalized cirrhotic patients in China. *World J Gastroenterol*, 2013 Aug 14;19(30):4984-91.
54. Tapper EB, Parikh ND, Sengupta N, Mellinger J, Ratz D, Lok ASF, et al. A risk score to predict the development of hepatic encephalopathy in a population-based cohort of patients with cirrhosis. *Hepatology*, 2018;68(4):1498–507.
55. Hartmann IJ, Groeneweg M, Quero JC, Beijeman SJ, de Man RA, Hop WC, et al. The prognostic significance of subclinical hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol*, 2000 Aug;95(8):2029-34.
56. Tapper EB, Zhao L, Nikirk S, Baki J, Parikh ND, Lok AS, Waljee AK. Incidence and Bedside Predictors of the First Episode of Overt Hepatic Encephalopathy in Patients With Cirrhosis. *Am J Gastroenterol*, 2020 Dec;115(12):2017-2025.
57. Guevara M, Baccaro ME, Ríos J, Martín-Llahí M, Uriz J, Ruiz del Arbol L, et al. Risk factors for hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis and refractory ascites: relevance of serum sodium concentration. *Liver Int*, 2010;30(8):1137–42.
58. Bossen L, Ginès P, Vilstrup H, Watson H, Jepsen P. Serum sodium as a risk factor for hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis and ascites. *J Gastroenterol Hepatol*, 2019 May;34(5):914-920.
59. Nardelli S, Gioia S, Ridola L, Farcomeni A, Merli M, Riggio O. Proton pump inhibitors are associated with minimal and overt hepatic encephalopathy and increased mortality in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 2019;70(2):640–9.
60. Alsahhar J, Rahimi R. Updates on the pathophysiology and therapeutic targets for hepatic encephalopathy. *Curr Opin Gastroenterol*, 2019;35(3):145–54.
61. Bajaj JS, Wade JB, Gibson DP, Heuman DM, Thacker LR, Sterling RK, et al. The multi-dimensional burden of cirrhosis and hepatic encephalopathy on patients and caregivers. *Am J Gastroenterol*, 2011;106(9):1646–53.
62. Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V, et al. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1999;30:890-895.

63. Stewart CA, Malinchoc M, Kim WR, Kamath PS. Hepatic encephalopathy as a predictor of survival in patients with end-stage liver disease. *Liver Transpl*, 2007;13(10): 1366–71.
64. Wang A-J, Peng A-P, Li B-M, Gan N, Pei L, Zheng XL, et al. Natural history of covert hepatic encephalopathy: an observational study of 366 cirrhotic patients. *World J Gastroenterol*, 2017; 23(34):6321.
65. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol*, 2006;44(1):217–31.
66. Wong RJ, Gish RG, Ahmed A. Hepatic encephalopathy is associated with significantly increased mortality among patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl*, 2014;20(12):1454–61.
67. Nardone R, Taylor AC, Höller Y, Brigo F, Lochner P, Trinkka E. Minimal hepatic encephalopathy: A review. *Neurosci Res*, 2016 Oct;111:1-12.
68. Damulin IV. Minimal hepatic encephalopathy: current clinical and pathogenetic aspects. *Ter Arkh*. 2018 Feb 15;90(2):89-93.
69. Agrawal S, Umopathy S, Dhiman RK. Minimal hepatic encephalopathy impairs quality of life. *J Clin Exp Hepatol*. 2015 Mar;5(Suppl 1):S42-8.
70. Ridola L, Nardelli S, Gioia S, Riggio O. Quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol*, 2018 Dec 28;24(48):5446-5453.
71. Ridola L, Cardinale V, Riggio O. The burden of minimal hepatic encephalopathy: from diagnosis to therapeutic strategies. *Ann Gastroenterol* 2018;31(2):151–64.
72. Romero-Gómez M, Boza F, García-Valdecasas MS, García E, Aguilar-Reina J. Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol*, 2001;96(9):2718–23.
73. Weissenborn K. Hepatic Encephalopathy: Definition, Clinical Grading and Diagnostic Principles. *Drugs*, 2019 Feb;79(Suppl 1):5-9.
74. Cordoba J, Cabrera J, Lataif L, Penev P, Zee P, Blei AT. High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology*, 1998 Feb;27(2):339–45.
75. Weissenborn K, Bokemeyer M, Krause J, Ennen J, Ahl B. Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS* 2005;19(Suppl 3):S93-S98.
76. Timmermann L, Gross J, Butz M, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A. Mini-asterixis in hepatic encephalopathy induced by pathologic thalamo-motor-cortical coupling. *Neurology*, 2003;61(5):689–92.

77. Khungar V, Poordad F. Hepatic encephalopathy. *Clin Liver Dis*, 2012 May;16(2):301-20.
78. Tryc AB, Goldbecker A, Berding G, Rümke S, Afshar K, Shahrezaei GH, et al. Cirrhosis-related Parkinsonism: prevalence, mechanisms and response to treatments. *J Hepatol* 2013;58(4):698–705.
79. Hassanein TI, Hilsabeck RC, Perry W. Introduction to the hepatic encephalopathy scoring algorithm (HESA). *Dig Dis Sci* 2008;53(2):529–38.
80. Ortiz M, Córdoba J, Doval E, Jacas C, Pujadas F, Esteban R, et al. Development of a clinical hepatic encephalopathy staging scale. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26(6):859–67.
81. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*, 1974 Jul 13;2(7872):81-4.
82. Lockwood AH. Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 2004 Dec;19(3-4):345-9.
83. Ge PS, Runyon BA. Serum ammonia level for the evaluation of hepatic encephalopathy. *JAMA* 2014;312(6):643–4.
84. Ninan J, Feldman L. Ammonia Levels and Hepatic Encephalopathy in Patients with Known Chronic Liver Disease. *J Hosp Med*. 2017 Aug;12(8):659-661.
85. Bernthal P, Hays A, Tarter RE, Thiel DV, Lecky J, Hegedus A. Cerebral CTscan abnormalities in cholestatic and hepatocellular disease and their relationship to neuropsychologic test performance. *Hepatology*, 1987;7(1):107–14.
86. Kumar S, Modi R, Bhandari BM, Sass DA, Rothstein KD. A head CT is unnecessary in the initial evaluation of a cirrhotic patient with recurrent hepatic encephalopathy. *Ann Hepatol* 2018;17(5):810–4.
87. Guerit JM, Amantini A, Fischer C, Kaplan PW, Mecarelli O, Schnitzler A, et al. Neurophysiological investigations of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver Int*, 2009 Jul;29(6):789-96.
88. Randolph C, Hilsabeck R, Kato A, Kharbanda P, Li YY, Mapelli D, et al. Neuropsychological assessment of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver Int*, 2009 May;29(5):629-35.
89. Goldbecker A, Weissenborn K, Hamidi Shahrezaei G, Afshar K, Rümke S, Barg-Hock H, et al. Comparison of the most favoured methods for the diagnosis of hepatic encephalopathy in liver transplantation candidates. *Gut*, 2013 Oct;62(10):1497-504.

90. Weissenborn K. Minimal/Covert Hepatic Encephalopathy - Impact of Comorbid Conditions. *J Clin Exp Hepatol*, Jan-Feb 2019;9(1):109-111.
91. Nabi E, Bajaj JS. Useful tests for hepatic encephalopathy in clinical practice. *Curr Gastroenterol Rep*, 2014;16(1):362.
92. Amodio P, Montagnese S. Clinical neurophysiology of hepatic encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol*, 2015;5(Suppl 1):S60–8.
93. Jaffe A, Lim JK, Jakab SS. Pathophysiology of Hepatic Encephalopathy. *Clin Liver Dis*, 2020 May;24(2):175-188.
94. Jayakumar AR, Norenberg MD. Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol*, 2018 Sep;8(3)-272-280.
95. Butterworth RF. Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology. *Drugs*, 2019 Feb;79(Suppl 1):17-21.
96. Merli M, Giusto M, Lucidi C, Giannelli V, Pentassuglio I, Gregorio VD, et al. Muscle depletion increases the risk of overt and minimal hepatic encephalopathy: results of a prospective study. *MetabBrain Dis*, 2013;28:281–4.
97. Jawaro T, Yang A, Dixit D, Bridgeman MB. Management of hepatic encephalopathy: a primer. *Ann Pharmacother*, 2016 Jul;50(7):569–77.
98. Gluud LL, Dam G, Les I, Marchesini G, Borre M, Aagaard NK, et al. Branched-chain amino acids for people with hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017 May 18;5(5):CD001939.
99. Takuma Y, Nouse K, Makino Y, Hayashi M, Takahashi H. Clinical trial: oral zinc in hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010 Nov;32(9):1080–90.
100. Chavez-Tapia NC, Cesar-Arce A, Barrientos-Gutierrez T, Villegas-López FA, Méndez-Sánchez N, Uribe M. A systematic review and meta-analysis of the use of oral zinc in the treatment of hepatic encephalopathy. *Nutr J*, 2013 Jun 6;12:74.
101. Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema?. *J Hepatol*, 2000 Jun; 32(6):1035-8.
102. Görg B, Schliess F, Häussinger D. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys*, 2013 Aug 15; 536(2):158-63.
103. Guevara M, Baccaro ME, Torre A, Gómez-Ansón B, Ríos J, Torres F, et al. Hyponatremia is a risk factor of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a

- prospective study with time-dependent analysis. *Am J Gastroenterol*, 2009 Jun;104(6):382–9.
104. James JH, Ziparo V, Jeppsson B, Fischer JE. Hyperammonaemia, plasma aminoacid imbalance, and blood-brain aminoacid transport: a unified theory of portal-systemic encephalopathy. *Lancet*, 1979 Oct 13;2(8146):772-5.
  105. Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riodan SM. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 2004 May;39(5):1441–9.
  106. Ahluwalia V, Betrapally NS, Hylemon PB, White MB, Gillevet PM, Unser AB, et al. Impaired gut-liver-brain axis in patients with cirrhosis. *Sci Rep*, 2016 May 26;6:26800.
  107. Cao Q, Yu CB, Yang SG, Cao HC, Chen P, Deng M, et al. Effect of probiotic treatment on cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2018 Feb;17(1):9–16.
  108. Bajaj JS, Salzman NH, Acharya C, Sterling RK, White MB, Gavis EA, et al. Fecal microbial transplant capsules are safe in hepatic encephalopathy: a phase 1, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology*, 2019 Nov;70(5):1960-1703.
  109. Felipo V. Hepatic Encephalopathy: Effects of Liver Failure on Brain Function. *Nat Rev Neurosci*, 2013 Dec;14(12):851-8.
  110. Schafer DF, Jones EA. Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system. *Lancet*, 1982 Jan 2; 1(8262):18-20.
  111. Fischer JE, Baldessarini RJ. False neurotransmitters and hepatic failure. *Lancet*, 1971 Jul 10; 2(7715):75-80.
  112. Butterworth RF. Neurosteroids in hepatic encephalopathy: Novel insights and new therapeutic opportunities. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 Jun; 160():94-7.
  113. Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol*, 2002 Jul;67(4):259–79.
  114. Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C. Benzodiazepine receptor antagonists for hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004;(2):CD002798.
  115. Bouabid S, Tinakoua A, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A. Manganese neurotoxicity: behavior disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. *J Neurochem*, 2016 Feb;136(4):677–91.

116. Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Ríos C. Striatal manganese accumulation induces changes in dopamine metabolism in the cirrhotic rat. *Brain Res*, 2001 Feb 9; 891(1-2):123-9.
117. Jellinger K, Riederer P, Kleinberger G, Wuketich S, Kothbauer P. Brain monoamines in human hepatic encephalopathy. *Acta Neuropathol*, 1978 Aug 7;43(1-2):63–8.
118. Dantzer R, O'Connor JC, Lawson MA, Kelley KW. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology*, 2011 Apr;36(3):426–36.
119. Butterworth RF. Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Int*, 2002 Aug-Sep;41(2–3):81–5.
120. Hamberger A, Lindroth P, Nyström B. Regulation of glutamate biosynthesis and release in vitro by low levels of ammonium ions. *Brain Res*, 1982 Apr 15;237(2):339–50.
121. Bellot P, France's R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int*, 2013 Jan;33(1):31–9.
122. Nagpal R, Yadav H. Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Ann Nutr Metab*, 2017;71 Suppl 1:11-16.
123. Clària J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, et al; CANONIC Study Investigators of the EASL-CLIF Consortium and the European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure (EF-CLIF). Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology*, 2016;64(4):1249-64.
124. Bernardi M, Moreau R, Angeli P, Schnabl B, Arroyo V. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. *J Hepatol*, 2015 Nov;63(5):1272–84.
125. Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med*, 2009 Oct; 37(10 Suppl):S331-6.
126. Odeh M, Sabo E, Sruogo I, Oliven A. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and ammonia in patients with hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Ann Med*, 2005;37(8):603–12.

127. Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, Olmo JA, Urios A, Rodrigo JM, Felipo V. IL-6 and IL-18 in Blood May Discriminate Cirrhotic Patients With and Without Minimal Hepatic Encephalopathy. *J Clin Gastroenterol*, 2009 Mar;43(3):272-9.
128. Felipo V, Urios A, Montesinos E, Molina I, Garcia-Torres ML, Civera M, et al. Contribution of Hyperammonemia and Inflammatory Factors to Cognitive Impairment in Minimal Hepatic Encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 2012 Mar;27(1):51-8.
129. Córdoba J, López-Hellín J, Planas M, Sabín P, Sanpedro F, Castro F, et al. Normal protein diet for episodic hepatic encephalopathy: results of a randomized study. *J Hepatol*, 2004 Jul;41(1):38-43.
130. Bianchi GP, Marchesini G, Fabbri A, Rondelli A, Bugianesi E, Zoli M, et al. Vegetable versus animal protein diet in cirrhotic patients with chronic encephalopathy. A randomized cross-over comparison. *J Intern Med*, 1993 May;233(5):385-92.
131. Han K-H. Mechanisms of the effects of acidosis and hypokalemia on renal ammonia metabolism. *Electrolyte Blood Press*, 2011 Dec;9(2):45-9.
132. Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C. Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *BMJ*, 2004 May 1; 328(7447):1046.
133. Uribe M, et al. Acidifying enemas (lactitol and lactose) vs. nonacidifying enemas (tap water) to treat acute portal-systemic encephalopathy: a double-blind, randomized clinical trial. *Hepatology* 1987;7(4):639-43.
134. Sharma P, Sharma BC. Disaccharides in the treatment of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 2013;28(2):313-20.
135. Bajaj J, Sanyal A, Bell D, Gilles H, Hueuman D. Predictors of the recurrence of hepatic encephalopathy in lactulose-treated patients. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010;31(9):1012-17.
136. Sharma BC, Sharma P, Agrawal A, Sarin SK. Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy: an open-label randomized controlled trial of lactulose versus placebo. *Gastroenterology*, 2009 Sep;137(3):885-91, 891.e1.
137. Bajaj JS. Review Article: Potential Mechanisms of Action of Rifaximin in the Management of Hepatic Encephalopathy and Other Complications of Cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016 Jan;43 Suppl 1:11-26.
138. Mullen KD, Sanyal AJ, Bass NM, Poordad FF, Sheikh MY, Frederick RT, et al. Rifaximin is safe and well tolerated for long-term maintenance of remission from overt hepatic encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014;12(8):1390-7.e2.

139. Jiang Q, Jiang XH, Zheng MH, Jiang LM, Chen YP, Wang L. Rifaximin versus nonabsorbable disaccharides in the management of hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2008 Nov;20(11):1064-70.
140. Sharma BC, Sharma P, Lunia MK, Srivastava S, Goyal R, Sarin SK. A randomized, double-blind, controlled trial comparing rifaximin plus lactulose with lactulose alone in treatment of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol*, 2013 Sep;108(9):1458-63.
141. Di Piazza S, Filippazzo MG, Valenza LM, Morello S, Pastore L, Conti A, et al. Rifaximine versus neomycin in the treatment of portosystemic encephalopathy. *Ital J Gastroenterol*, 1991 Sep-Oct;23(7):403-7.
142. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, et al. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med*, 2010 Mar 25; 362(12):1071-81.
143. Mohammad RA, Regal RE, Alaniz C. Combination therapy for the treatment and prevention of hepatic encephalopathy. *Ann Pharmacother*, 2012 Nov;46(11):1559–63.
144. Bannister CA, Orr JG, Reynolds AV, et al. Natural history of patients taking rifaximin-alpha for recurrent hepatic encephalopathy and risk of future overt episodes and mortality: a post-hoc analysis of clinical trials data. *Clin Ther*, 2016 May;38(5):1081-89.e4.
145. Hudson M, Schuchmann M. Long-term management of hepatic encephalopathy with lactulose and/or rifaximin: a review of the evidence. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2019 Apr;31(4):434-50.
146. Bajaj JS, Barrett AC, Bortey E, Paterson C, Forbes WP. Prolonged remission from hepatic encephalopathy with rifaximin: results of a placebo crossover analysis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015 Jan;41(1):39-45.
147. Kang SH, Lee YB, Lee JH, Nam JY, Chang Y, Cho H, et al. Rifaximin treatment is associated with reduced risk of cirrhotic complications and prolonged overall survival in patients experiencing hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017 Nov;46(9):845-55.
148. Ryan JD, Tsochatzis EA. Rifaximin treatment for encephalopathy reduces hospital resource use: real-world data don't fail to IMPRESS. *Frontline Gastroenterol*, 2017 Oct;8(4):230-31.
149. Kabeshova A, Hariz SB, Tsakeu E, Benamouzig B, Launois R. Cost-effectiveness analysis of rifaximin- $\alpha$  administration for the reduction of episodes of overt hepatic



- encephalopathy in recurrence compared with standard treatment in France. *Therap Adv Gastroenterol*, 2016 Jul;9(4):473-82.
150. Mullen KD, Sanyal AJ, Bass NM, Poordad FF, Sheikh MY, Frederick RT, et al. Rifaximin is safe and well tolerated for long-term maintenance of remission from overt hepatic encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014 Aug;12(8):1390-7.e2.
151. Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, Chedid A, DeJoseph MR. Neomycin reduces the intestinal production of ammonia from glutamine. *Adv Exp Med Biol*, 1994; 368:125-34.
152. Morgan MH, Read AE, Speller DC. Treatment of hepatic encephalopathy with metronidazole. *Gut*, 1982 Jan;23(1):1-7.
153. Ndraha S, Hasan I, Simadibrata M. The effect of L-ornithine L-aspartate and branch chain amino acids on encephalopathy and nutritional status in liver cirrhosis with malnutrition. *Acta Med Indones*, 2011 Jan;43(1):18-22.
154. Acharya C, Bajaj JS. Current management of hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol*, 2018 Nov;113(11):1600–12.
155. Goh ET, Sokes CS, Sidhu SS, Vilstrup H, Gluud LL, Morgan MY. L-ornithine L-aspartate for prevention and treatment of hepatic encephalopathy in people with cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018 May 15;5(5):CD012410.
156. Agrawal A, Sharma BC, Sharma P, Sarin SK. Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: an open-label, randomized controlled trial of lactulose, probiotics, and no therapy. *Am J Gastroenterol*, 2012 Jul;107(7):1043-50.
157. Goh ET, et al. Flumazenil versus placebo or no intervention for people with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;(7):CD002798.
158. Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C. Benzodiazepine receptor antagonists for hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(2):CD002798.
159. Junker AE, Als-Nielsen B, Gluud C, Gluud LL. Dopamine agents for hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014 Feb 10;(2):CD003047.
160. Takuma Y, Nouse K, Makino Y, Hayashi M, Takahashi H. Clinical trial: oral zinc in hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010 Nov;32(9):1080–90.
161. Chavez-Tapia NC, Cesar-Arce A, Barrientos-Gutiérrez T, Villegas-López FA, Méndez-Sánchez N, Uribe M. A systematic review and meta-analysis of the use of oral zinc in the treatment of hepatic encephalopathy. *Nutr J*, 2013 Jun 6;12:74.

162. Kao D, Roach B, Park H, Hotte N, Madsen K, Brain V, et al. Fecal microbiota transplantation in the management of hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 2016 Jan;63(1):339–40.
163. Maharshi S, Sharma BC, Sachdeva S, Srivastava S, Sharma P. Efficacy of Nutritional Therapy for Patients With Cirrhosis and Minimal Hepatic Encephalopathy in a Randomized Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016 Mar;14(3):454-60.
164. Dhiman RK, Sawhney MS, Chawla YK, Das G, Ram S, Dilawari JB. Efficacy of lactulose in cirrhotic patients with subclinical hepatic encephalopathy. *Dig Dis Sci*, 2000 Aug;45(8):1549–52.
165. Sharma P, Sharma BC, Agrawal A, Sarin SK. Primary prophylaxis of overt hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: an open labeled randomized controlled trial of lactulose versus no lactulose. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012 Aug;27(8):1329-35.
166. Prasad S, Dhiman RK, Duseja A, Chawla YK, Sharma A, Agarwal R. Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 2007 Mar;45(3):549–59.
167. Sidhu SS, Goyal O, Mishra BP, Sood A, Chhina RS, Soni RK. Rifaximin improves psychometric performance and health-related quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy (the RIME Trial). *Am J Gastroenterol*, 2011 Feb; 106(2):307-16.
168. Bajaj JS, Heuman DM, Wade JB, Gibson DP, Saeian K, Wegelin JA, et al. Rifaximin improves driving simulator performance in a randomized trial of patients with minimal hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 2011 Feb;140(2):478-487.e1.
169. Zhao LN, Yu T, Lan S, Hou J, Zhang Z, Wang S, et al. Probiotics can improve the clinical outcomes of hepatic encephalopathy: an update meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015 Dec;39(6):674-82.
170. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 2016 Apr 22;352(6284):aaf1098.
171. Chaplin DD. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol*, 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23.
172. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The Interface Between Innate and Adaptive Immunity. *Nat Immunol*, 2004 Oct;5(10):971-4.
173. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. *Inmunología*. 8th Edition. Saunders: Elsevier; 2013.

174. Parkin J, Cohen B. An Overview of the Immune System. *Lancet*, 2001 Jun 2;357(9270):1777-89.
175. Dumitriu IE. The life (and death) of CD4+CD28null T cells in inflammatory diseases. *Immunology*, 2015 Oct;146(2):185-193.
176. Maly K, Schirmer M. The Story of CD4+ CD28- T Cells Revisited: Solved or Still Ongoing?. *J Immunol Res*, 2015;2015:348746.
177. Broux B, Pannemans K, Zhang X, Markovic-Plese S, Broekmans T, Eijnde BO, et al. CX(3)CR1 Drives Cytotoxic CD4(+)CD28(-) T Cells Into the Brain of Multiple Sclerosis Patients. *J Autoimmun*, 2012 Feb;38(1):10-9.
178. Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol*, 2013 Nov; 34(11):556-63.
179. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations (\*). *Annu Rev Immunol*, 2010;28:445-89.
180. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*, 2010 Nov;238(1):247-62.
181. Noack M, Miossec P. Th17 and Regulatory T Cell Balance in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Autoimmun Rev*, 2014 Jun;13(6):668-77.
182. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular Mechanisms of IL-17-induced Blood-Brain Barrier Disruption. *FASEB J*, 2010 Apr;24(4):1023-34.
183. Paulissen SMJ, Hamburg JP, Dankers W, Lubberts E. The Role and Modulation of CCR6+ Th17 Cell Populations in Rheumatoid Arthritis. *Cytokine*, 2015 Jul;74(1):43-53.
184. Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory T Cells in Autoimmune Neuroinflammation. *Immunol Rev*, 2014 May;259(1):231-44.
185. Dansokho C, Ahmed DA, Aid S, Toly-Ndour C, Chaigneau T, Calle V, et al. Regulatory T Cells Delay Disease Progression in Alzheimer-like Pathology. *Brain*, 2016 Apr;139(Pt 4):1237-51.
186. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood. *Blood*, 2010 Oct 21;116(16):e74-80.
187. Shi C, Pamer EG. Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2011 Oct 10;11(11):762-74.

188. Ghosh M, Xu Y, Pearse DD. Cyclic AMP is a key regulator of M1 to M2a phenotypic conversion of microglia in the presence of Th2 cytokines. *J Neuroinflammation*, 2016 Jan 13;13:9.
189. Hardbower DM, Singh K, Asim M, Verriere TG, Olivares-Villagómez D, Barry DP, et al. EGFR Regulates Macrophage Activation and Function in Bacterial Infection. *J Clin Invest*, 2016 Sep 1;126(9):3296-312.
190. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?. *Trends Mol Med*, 2013 Oct;19(10):625–632.
191. Shinoda K, Tokoyoda K, Hanazawa A, Hayashizaki K, Zehentmeier S, Hosokawa H, et al. Type II Membrane Protein CD69 Regulates the Formation of Resting T-helper Memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012 May 8;109(19):7409-14.
192. Filellaa X, Molina R, Ballesta AM. Estructura y función de las citocinas. *Med Integral*, 2002;39(2);63-71.
193. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF Alpha Therapy of Rheumatoid Arthritis: What Have We Learned?. *Annu Rev Immunol*, 2001;19:163-96.
194. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*, 1987 Dec 17-23;330(6149):662-4.
195. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The Pro- And Anti-Inflammatory Properties of the Cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 2011 May;1813(5):878-88.
196. Gattorno M, Piccini A, Lasigliè D, Tassi S, Brisca G, Carta S, et al. The Pattern of Response to anti-interleukin-1 Treatment Distinguishes Two Subsets of Patients With Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008 May;58(5):1505-15.
197. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol*, 2012;2012:925135.
198. Perera PY, Lichy JH, Waldmann TA, Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect*, 2012 Mar;14(3):247-61.
199. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*, 2013 Oct 8;4:289.

200. Lubberts E, Koenders MI, Berg WB. The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal model. *Arthritis Res Ther*, 2005;7(1):29-37.
201. Gonzalez-García I, Zhao Y, Ju S, Gu Q, Liu L, Kolls JK, et al. IL-17 signaling independent central nervous system autoimmunity is negatively regulated by TGF $\beta$ . *J Immunol*, 2009 Mar 1;182(5):2665-71.
202. Moens L, Tangye SG. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front Immunol*, 2014 Feb 18;5:65.
203. Vallières F, Girard D. IL-21 Enhances Phagocytosis in Mononuclear Phagocyte Cells: Identification of Spleen Tyrosine Kinase as a Novel Molecular Target of IL-21. *J Immunol*, 2013 Mar 15;190(6):2904-12.
204. Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MR. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol*, 2015;33:747-85.
205. Kazanietz MG, Durando M, Cooke M. CXCL13 and Its Receptor CXCR5 in Cancer: Inflammation, Immune Response, and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019 Jul 12;10:471.
206. Liu W, Jiang L, Bian C, Liang Y, Xing R, Yishakea M, et al. Role of CX3CL1 in Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2016 Oct;64(5):371-83.
207. Affò S, Morales-Ibanez O, Rodrigo-Torres D, Altamirano J, Blaya D, Dapito DH, et al. CCL20 Mediates Lipopolysaccharide Induced Liver Injury and Is a Potential Driver of Inflammation and Fibrosis in Alcoholic Hepatitis. *Gut*, 2014 Nov;63(11):1782-92.
208. Ledebøer A, Brevé JJ, Poole S, Tilders FJ, Dam AM. 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*, 2000 Apr;30(2):134-42.
209. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, et al. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function. *Nature*, 2008 May 8; 453(7192):236-40.
210. Simard AR, Rivest S. Do Pathogen Exposure and Innate Immunity Cause Brain Diseases?. *Neurol Res*, 2005 Oct;27(7):717-25.
211. Savage CD, Lopez-Castejon G, Denes A, Brough D. NLRP3-Inflammasome Activating DAMPs Stimulate an Inflammatory Response in Glia in the Absence of

- Priming Which Contributes to Brain Inflammation After Injury. *Front Immunol*, 2012 Sep 18;3:288.
212. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 2013 Jan 9;77(1):10-8.
213. Griffiths MR, Gasque P, Neal JW. The Regulation of the CNS Innate Immune Response Is Vital for the Restoration of Tissue Homeostasis (Repair) After Acute Brain Injury: A Brief Review. *Int J Inflam*, 2010 Aug 9;2010:151097.
214. Shechter R, Schwartz M. Harnessing Monocyte-Derived Macrophages to Control Central Nervous System Pathologies: No Longer 'If' but 'How'. *J Pathol*, 2013 Jan;229(2):332-46.
215. Laflamme N, Rivest S. Toll-like Receptor 4: The Missing Link of the Cerebral Innate Immune Response Triggered by Circulating Gram-Negative Bacterial Cell Wall Components. *FASEB J*, 2001 Jan;15(1):155-163.
216. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of Multiple Sclerosis. *Nat Rev Immunol*, 2015 Sep 15;15(9):545-58.
217. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*, 2010 Nov;10(11):753-66.
218. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*, 2013 Oct;14(10):996–1006.
219. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S54-62.
220. Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR. Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011 Sep;9(9):727-38.
221. Jalan R, Gines P, Olson JC, Mookerjee RP, Moreau R, Garcia-Tsao G, et al. Acute-on chronic liver failure. *J Hepatol*, 2012 Dec; 57(6):1336-48.
222. Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated Immune Dysfunction: Distinctive Features and Clinical Relevance. *J Hepatol*, 2014 Dec;61(6):1385-96.
223. Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Frances R, Shah N, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol*, 2011 Sep;55(3):574–581.
224. Seidler S, Zimmermann HW, Weiskirchen R, Trautwein C, Tacke F. Elevated circulating soluble interleukin-2 receptor in patients with chronic liver diseases is associated with non-classical monocytes. *BMC Gastroenterol*, 2012 Apr 24;12:38.

225. Doi H, Iyer TK, Carpenter E, Li H, Chang KM, Vonderheide RH, et al. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology*, 2012 Mar;55(3):709-19.
226. McGovern BH, Golan Y, Lopez M, Pratt D, Lawton A, Moore G, et al. The impact of cirrhosis on CD4+ T cell counts in HIV-seronegative patients. *Clin Infect Dis*, 2007 Feb 1;44(3):431-7.
227. Zheng M, Sun H, Tian Z. Natural killer cells in liver diseases. *Front Med*, 2018 Jun;12(3):269-279.
228. Munoz L, Borrero MJ, Ubeda M, Lario M, Diaz D, Frances R, et al. Interaction between intestinal dendritic cells and bacteria translocated from the gut in rats with cirrhosis. *Hepatology*, 2012 Nov;56(5):1861-9.
229. Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CE, Roos L, Slavik T, Stivaktas PI, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol*, 2013 Jun;58(6):1125-32.
230. Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Rückert N, Hecker H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol*, 2001 May;34(5):768-73.
231. Romero-Gómez M, Córdoba J, Jover R, del Olmo J, Fernández A, Flavià M, et al; Red Nacional de Investigación en Encefalopatía Hepática. Normality tables in the Spanish population for psychometric tests used in the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy. *Med Clin (Barc)*, 2006 Jul 15;127(7):246-9.
232. Weissenborn K. Diagnosis of minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol*, 2015;5(Suppl 1):S54-9.
233. Bajaj JS, Thacker LR, Heuman DM, Fuchs M, Sterling RK, Sanyal AJ, et al. The Stroop smartphone application is a short and valid method to screen for minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 2013 Sep;58(3):1122-32.
234. Golden CJ. Stroop. Test de colores y palabras. 3º edición. Madrid: TEA Ediciones; 2001.
235. Brickenkamp R. Test d2. 4ª edición. Madrid: TEA Ediciones, 2012.
236. Erdodi LA, Abeare CA, Lichtenstein JD, Tyson BT, Kucharski B, Zuccato BG, et al. Wechsler Adult Intelligence Scale-Fourth Edition (WAIS-IV) processing speed scores as measures of noncredible responding: The third generation of embedded performance validity indicators. *Psychol Assess*, 2017 Feb;29(2):148-157.

237. Chernecky CC, Berger BJ. Ammonia (NH<sub>3</sub>) - blood and urine. In: Chernecky CC, Berger BJ, eds. *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*. 6th ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders; 2013:126-127.
238. Osterberg L, Blaschke T. Adherence to medication. *N Engl J Med*, 2005 Aug 4;353(5):487-97.
239. Gale SA, Acar D, Daffner KR. Dementia. *Am J Med*. 2018 Oct;131(10):1161-1169.
240. Saboo K, Shamsaddini A, Iyer MV, Hu C, Fagan A, Gavis EA, et al. Sex is associated with differences in gut microbial composition and function in hepatic encephalopathy. *J Hepatol*, 2020 Jul 15:S0168-8278(20)30457-8.
241. Ampuero J, Ranchal I, del Mar Díaz-Herrero M, del Campo JA, Bautista JD, Romero-Gómez M. Role of diabetes mellitus on hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 2013 Jun;28(2):277-9.
242. Hung TH, Tseng CW, Tseng KC, Hsieh YH, Tsai CC, Tsai CC. Effect of renal function impairment on the mortality of cirrhotic patients with hepatic encephalopathy: a population-based 3-year follow-up study. *Medicine (Baltimore)*, 2014 Sep;93(14):e79.
243. Fouarge E, Maquet P. Neurological consequences of alcoholism. *Rev Med Liege*, 2019 May;74(5-6):310-313.
244. Das D, Pandya M. Recent Advancement of Direct-acting Antiviral Agents (DAAs) in Hepatitis C Therapy. *Mini Rev Med Chem*, 2018;18(7):584-596.
245. Romero-Gómez M, Córdoba J, Jover R, del Olmo JA, Ramírez M, Rey R, et al. Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 2007;45:879-85.
246. Garg H, Gupta S, Anand AC, Broor SL. Portal hypertensive gastropathy and gastric antral vascular ectasia. *Indian J Gastroenterol*, 2015 Sep;34(5):351-8.
247. Alvares-da-Silva MR, Reverbel da Silveira T. Comparison between handgrip strength, subjective global assessment, and prognostic nutritional index in assessing malnutrition and predicting clinical outcome in cirrhotic outpatients. *Nutrition*, 2005;21(2):113-7.
248. Ghadir MR, Riahin AA, Havaspour A, Nooranipour M, Habibinejad AA. The relationship between lipid profile and severity of liver damage in cirrhotic patients. *Hepat Mon*, Fall 2010;10(4): 285-8.



249. Gold JM, Goldbeg RW, McNary SW, Dixon LB, Lehman AF. Cognitive correlates of job tenure among patients with severe mental illness. *Am J Psychiatry*, 2002 Aug;159(8):1395-402.
250. Miller EK, Lundqvist M, Bastos AM. Working Memory 2.0. *Neuron*, 2018 Oct 24;100(2):463-475.
251. Biessels GJ, Despa F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Oct;14(10):591-604.
252. Dumitriu IE. The life (and death) of CD4<sup>+</sup> CD28(null) T cells in inflammatory diseases. *Immunology*, 2015 Oct;146(2):185-93.
253. Maly K, Schirmer M. The story of CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells revisited: solved or still ongoing?. *J Immunol Res*, 2015;2015:348746.
254. Mangas-Losada A, García-García R, Urios A, Escudero-García D, Tosca J, Giner-Durán R, et al. Minimal hepatic encephalopathy is associated with expansion and activation of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, Th22 and Tfh and B lymphocytes. *Sci Rep*. 2017;7:6683.
255. Meffre E, O'Connor KC. Impaired B-cell tolerance checkpoints promote the development of autoimmune diseases and pathogenic autoantibodies. *Immunol Rev*, 2019 Nov;292(1):90-101.



## **X. TABLAS Y FIGURAS**



## 1. TABLAS

- **Tabla 1.** Rangos fisiológicos de los parámetros analíticos.
- **Tabla 2.** Escalas Child-Pugh y MELD.
- **Tabla 3.** Gravedad de las manifestaciones clínicas según la clasificación de West Haven y de la ISHEN.
- **Tabla 4.** Factores precipitantes de encefalopatía hepática por orden decreciente de frecuencia.
- **Tabla 5.** Escala de coma de Glasgow.
- **Tabla 6.** Diagnóstico diferencial de la hiperamonemia.
- **Tabla 7.** Efectividad de los tratamientos para la encefalopatía hepática.
- **Tabla 8.** Corrección por edad de los valores del test de Stroop.
- **Tabla 9.** Anticuerpos utilizados para la selección de poblaciones de linfocitos T y monocitos.
- **Tabla 10.** Kits comerciales ELISA.
- **Tabla 11.** Sondas utilizadas para medir los niveles de expresión de los genes de interés.
- **Tabla 12.** Anticuerpos utilizados para la determinación de niveles de IgG.
- **Tabla 13.** Factores clínicos en los distintos grupos del estudio.
- **Tabla 14.** Valores analíticos en los distintos grupos del estudio.
- **Tabla 15.** Análisis de correlación entre el PHES y las variables clínicas y analíticas.
- **Tabla 16.** Resultados de los test cognitivos en los distintos grupos del estudio.
- **Tabla 17.** Análisis de correlación entre el PHES y los test psicométricos.
- **Tabla 18.** AUROC de cada uno de los test psicométricos para el diagnóstico de EHM.
- **Tabla 19.** Resultados de los test de coordinación motora en los grupos del estudio.
- **Tabla 20.** Análisis de correlación entre el PHES y los test de coordinación.
- **Tabla 21.** AUROC de los test de coordinación motora para el diagnóstico de EHM.
- **Tabla 22.** Análisis de correlación entre los test psicométricos y los niveles de amonio en sangre.
- **Tabla 23.** Poblaciones leucocitarias en sangre periférica en los grupos del estudio.

- **Tabla 24.** Niveles de citocinas en suero en los grupos del estudio.
- **Tabla 25.** Análisis de correlación entre el PHES y los niveles de citocinas en suero.
- **Tabla 26.** Análisis de correlación entre los test psicométricos y los niveles de citocinas en suero.
- **Tabla 27.** AUROC de las diferentes citocinas para el diagnóstico de EHM.
- **Tabla 28.** Expresión de factores de transcripción característicos de subpoblaciones de linfocitos T en los distintos grupos del estudio.
- **Tabla 29.** Análisis de correlación entre el PHES y los niveles de expresión de factores de transcripción característicos de subpoblaciones de linfocitos T.
- **Tabla 30.** Evolución analítica de los pacientes con y sin EHM a los 3, 6 y 12 meses del inicio del estudio.
- **Tabla 31.** Factores clínicos comparados según la respuesta a la rifaximina.
- **Tabla 32.** Valores analíticos comparados según la respuesta a la rifaximina.
- **Tabla 33.** Valores analíticos a los 3, 6 y 12 meses del tratamiento con rifaximina en los grupos de pacientes respondedores y no respondedores.
- **Tabla 34.** Test psicométricos comparados según la respuesta a la rifaximina.
- **Tabla 35.** Test psicométricos a lo largo del seguimiento en ambos grupos.
- **Tabla 36.** Poblaciones leucocitarias en sangre periférica en los grupos de respuesta a la rifaximina al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.
- **Tabla 37.** Niveles de citocinas en sangre periférica en los grupos de respuesta a la rifaximina al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.
- **Tabla 38.** Factores de transcripción en los grupos de respuesta a la rifaximina al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses.

## 2. FIGURAS

- **Figura 1.** Histología de la cirrosis hepática: septos fibrosos y nódulos de regeneración (tinción tricrómica de Masson).
- **Figura 2.** Cambio porcentual estandarizado por edad en la incidencia de cirrosis hepática y otras enfermedades hepáticas crónicas desde 1990 a 2017 (casos nuevos por 100.000 habitantes).
- **Figura 3.** Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución de un sinusoide hepático. La luz del sinusoide (L) está revestida por el endotelio (E) dando lugar a fenestras (flechas pequeñas) y áreas recubiertas (asterisco). Se observa una partícula lipídica (flecha grande) pasando a través de las fenestras. El espacio de Disse (SD) se localiza entre el endotelio y los hepatocitos y contiene numerosas microvellosidades de las células parenquimatosas (P).
- **Figura 4.** Resumen de la fisiopatología de la hipertensión portal.
- **Figura 5.** Diagrama de las manifestaciones clínicas asociadas a los distintos estadios de la encefalopatía hepática.
- **Figura 6.** Esquema del desarrollo de los linfocitos B y linfocitos T. MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.
- **Figura 7.** Activación de los linfocitos B dependiente de células T.
- **Figura 8.** Esquema de la presentación de antígeno vía molécula del MHC de clase II y la respuesta inmune mediada por linfocitos T *helper*.
- **Figura 9.** Esquema de la presentación de antígeno vía molécula del MHC de clase I y la respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos.
- **Figura 10.** Linfocitos T *helper* efectores. Se muestran las interleucinas que inducen la diferenciación celular, el factor de transcripción característico y la producción de las principales citocinas por cada subpoblación.
- **Figura 11.** Esquema de activación de la microglía. La microglía “alternativa” se induce en situación de salud, fagocitando cuerpos apoptóticos y enviando señales de reparación y regeneración. La microglía “clásica” se induce al detectar algo ajeno (PAMP) o dañino (DAMP) y envía señales neurotóxicas.
- **Figura 12.** Relación entre el sistema periférico y el SNC. A: Activación de linfocitos a través de los receptores tipo Toll de órganos circunventriculares; B:

- Activación de la microglía del SNC a través de citocinas de la periferia; C: Infiltración de leucocitos de la periferia.
- **Figura 13.** Batería de test psicométricos PHES.
  - **Figura 14.** Test de Stroop. A: tarea congruente. B: tarea neutra. C: tarea incongruente.
  - **Figura 15.** Test d2.
  - **Figura 16.** Test orales. A: Claves oral; B: Dígitos Directo; C: Dígitos Inverso; D: Letras y números.
  - **Figura 17.** Test de coordinación motora. A: Bimanual; B: Visomotora.
  - **Figura 18.** Test de medición de amonio en sangre.
  - **Figura 19.** Citometría: ejemplo de estrategia de selección para los linfocitos CD4 autorreactivos (CD4+CD28-) y activados (CD69+).
  - **Figura 20.** Separación de PBMC. A: antes y B: después de la centrifugación.
  - **Figura 21.** Técnica de *western blot* para la cuantificación de proteínas.
  - **Figura 22.** Valores (media  $\pm$  EEM) del PHES en los grupos del estudio.
  - **Figura 23.** Número de ítems completados (media  $\pm$  EEM) del test de Stroop en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).
  - **Figura 24.** Puntuación (media  $\pm$  EEM) de los test orales en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).
  - **Figura 25.** Puntuación (media  $\pm$  EEM) del test d2 en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).
- Abreviaturas:** TR: total de respuestas; TA: total de aciertos; O: omisiones; C: comisiones; TOT: efectividad total de la prueba; CON: índice de concentración.
- **Figura 26.** Correlación lineal entre el PHES y el test de claves oral.
  - **Figura 27.** Correlación lineal entre el PHES y la tarea congruente del test de Stroop.
  - **Figura 28.** Curva ROC de la tarea congruente en el test de Stroop, el total de aciertos en el test d2 y el test de claves oral para el diagnóstico de EHM.



- **Figura 29.** Tiempo (media  $\pm$  EEM) en minutos de los test de coordinación en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001);  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha$ p<0,05;  $\alpha\alpha$ p<0,01;  $\alpha\alpha\alpha$ p<0,001).
- **Figura 30.** Curva ROC de los test motores para el diagnóstico de EHM.
- **Figura 31.** Nivel de amonio (media  $\pm$  EEM) en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001);  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha$ p<0,05;  $\alpha\alpha$ p<0,01;  $\alpha\alpha\alpha$ p<0,001).
- **Figura 32.** Correlación lineal entre el PHES y el nivel de amonio en sangre.
- **Figura 33.** Correlación lineal entre el nivel de amonio y de albúmina en sangre.
- **Figura 34.** Correlación lineal entre el nivel de amonio y de plaquetas en sangre.
- **Figura 35.** Porcentaje de monocitos (media  $\pm$  EEM) clásicos, intermedios y alternativos en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001);  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha$ p<0,05;  $\alpha\alpha$ p<0,01;  $\alpha\alpha\alpha$ p<0,001).
- **Figura 36.** Porcentaje de linfocitos T (media  $\pm$  EEM) autorreactivos (CD4+CD28-) y no autorreactivos (CD4+CD28+) en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001);  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha$ p<0,05;  $\alpha\alpha$ p<0,01;  $\alpha\alpha\alpha$ p<0,001).
- **Figura 37.** Porcentaje de linfocitos T (media  $\pm$  EEM) activados (CD69+) totales, autorreactivos (CD4+CD28-) y no autorreactivos (CD4+CD28+) en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001);  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha$ p<0,05;  $\alpha\alpha$ p<0,01;  $\alpha\alpha\alpha$ p<0,001).
- **Figura 38.** Niveles de citocinas (media  $\pm$  EEM) en pg/mL en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001);  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha$ p<0,05;  $\alpha\alpha$ p<0,01;  $\alpha\alpha\alpha$ p<0,001).
- **Figura 39.** Niveles de citocinas (media  $\pm$  EEM) en pg/mL para IL-6, IL-15 e IL-17 y en ng/mL para CX3CL1 en los grupos del estudio. \*significación estadística vs control (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001);  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha$ p<0,05;  $\alpha\alpha$ p<0,01;  $\alpha\alpha\alpha$ p<0,001).
- **Figura 40.** Grado de incremento en la expresión (media  $\pm$  EEM) de factores de transcripción característicos de subpoblaciones de linfocitos T en los grupos del

- estudio. \*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).
- **Figura 41.** Porcentaje de variación en los niveles de IgG en plasma (media  $\pm$  EEM) respecto a los controles en pacientes con y sin EHM. \*significación estadística vs control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\alpha$ significación estadística vs sin EHM ( $\alpha p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ ).
  - **Figura 42.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes con y sin EHM.
  - **Figura 43.** Curva de Kaplan-Meier con la probabilidad y el tiempo hasta el desarrollo de encefalopatía hepática clínica en los pacientes con y sin EHM.
  - **Figura 44.** Flujo de respuesta al tratamiento con rifaximina a los 3, 6 y 12 meses.
  - **Figura 45.** Valores del PHES (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.
  - **Figura 46.** Valores del Child-Pugh (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.  $^{\circ}$ significación estadística vs basal ( $^{\circ}p < 0,05$ ;  $^{\circ\circ}p < 0,01$ ;  $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$ );  $^{\beta}$ significación estadística vs respondedor ( $^{\beta}p < 0,05$ ;  $^{\beta\beta}p < 0,01$ ;  $^{\beta\beta\beta}p < 0,001$ ).
  - **Figura 47.** Valores del MELD (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.  $^{\circ}$ significación estadística vs basal ( $^{\circ}p < 0,05$ ;  $^{\circ\circ}p < 0,01$ ;  $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$ );  $^{\beta}$ significación estadística vs respondedor ( $^{\beta}p < 0,05$ ;  $^{\beta\beta}p < 0,01$ ;  $^{\beta\beta\beta}p < 0,001$ ).
  - **Figura 48.** Valores del test de Stroop (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.  $^{\circ}$ significación estadística vs basal ( $^{\circ}p < 0,05$ ;  $^{\circ\circ}p < 0,01$ ;  $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$ );  $^{\beta}$ significación estadística vs respondedor ( $^{\beta}p < 0,05$ ;  $^{\beta\beta}p < 0,01$ ;  $^{\beta\beta\beta}p < 0,001$ ).
  - **Figura 49.** Puntuación del test d2 (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.  $^{\circ}$ significación estadística vs basal ( $^{\circ}p < 0,05$ ;  $^{\circ\circ}p < 0,01$ ;  $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$ );  $^{\beta}$ significación estadística vs respondedor ( $^{\beta}p < 0,05$ ;  $^{\beta\beta}p < 0,01$ ;  $^{\beta\beta\beta}p < 0,001$ ). **Abreviaturas:** TR: total de respuestas; TA: total de aciertos; O: omisiones; C: comisiones; TOT: efectividad total en la prueba; CON: índice de concentración.
  - **Figura 50.** Puntuación de los test orales (media  $\pm$  EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses.

- <sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001); <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).
- **Figura 51.** Puntuación de los test de coordinación (media ± EEM) en minutos en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses. <sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001); <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).
  - **Figura 52.** Niveles de amonio (media ± EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses. <sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001); <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).
  - **Figura 53.** Porcentaje de monocitos (media ± EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses. <sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001).
  - **Figura 54.** Porcentaje de linfocitos T (media ± EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses. <sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001).
  - **Figura 55.** Porcentaje de linfocitos T activados (media ± EEM) en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses. <sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001).
  - **Figura 56.** Niveles de citocinas (media ± EEM) en pg/mL en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses. <sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001). <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).
  - **Figura 57.** Niveles de citocinas (media ± EEM) en pg/mL para IL-6, IL-15 e IL-17 y en ng/mL para CX3CL1 en los pacientes respondedores y no respondedores al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses. <sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001). <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).
  - **Figura 58.** Grado de incremento en la expresión de los factores de transcripción (media ± EEM) relativa a los controles al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses en ambos grupos de respuesta. <sup>o</sup>significación estadística vs basal (<sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01; <sup>ooo</sup>p<0,001). <sup>B</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>B</sup>p<0,05; <sup>BB</sup>p<0,01; <sup>BBB</sup>p<0,001).

- **Figura 59.** Porcentaje de variación en los niveles de IgG (media  $\pm$  EEM) respecto a los controles al inicio del tratamiento y a los 3 y 6 meses en ambos grupos de respuesta. <sup>â</sup>significación estadística vs basal (<sup>â</sup>p<0,05; <sup>ââ</sup>p<0,01; <sup>âââ</sup>p<0,001). <sup>â</sup>significación estadística vs respondedor (<sup>â</sup>p<0,05; <sup>ââ</sup>p<0,01; <sup>âââ</sup>p<0,001).

## **XI. ANEXOS**



## 1. ANEXO 1



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

### INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA

D. Antonio Peláez Hernández, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

#### CERTIFICA

Que en este Comité, en su circular de fecha 4 de septiembre de 2015, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

***Caracterización de las alteraciones neurológicas en pacientes con encefalopatía hepática mínima y de las alteraciones cerebrales responsables. Contribución del estrés oxidativo y la inflamación.***

Que será llevado a cabo en los Laboratorios de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínic Universitario de Valencia – INCLIVA y cuya investigadora principal es la Dra. Carmina Montoliu Felix, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la convocatoria de Ayudas del Instituto de Salud Carlos III.

Valencia, 4 de septiembre de 2015.

Fdo. : Dr. D. Antonio Peláez Hernández  
Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica

F-CE-GEva-15 Dictamen proyecto

## 2. ANEXO 2



DEPARTAMENTO  
DE MEDICAMENTOS  
DE USO HUMANO

**DESTINATARIO:**

**D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> PILAR BALLESTER FERRÉ  
C/ REGINO MAS, 3. PTA 4<sup>a</sup>  
46200 – PAIPORTA. VALENCIA**

**Fecha: 31 de octubre de 2017**

**REFERENCIA: ESTUDIO RIFAXIMINA-EHM**

**ASUNTO: NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DE CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO CLÍNICO O EPIDEMIOLÓGICO**

Adjunto se remite resolución de clasificación sobre el estudio titulado “**Caracterización del deterioro neurológico y la respuesta al tratamiento con Rifaximina en pacientes con cirrosis hepática y encefalopatía hepática mínima.**” con código **SER-HEP-2017-05.**

**CORREO ELECTRÓNICO**

farmacoepi@aemps.es



MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS  
SOCIALES E IGUALDAD  
REGISTRO AUXILIAR  
AGENCIA E. DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS  
SANITARIOS  
SALIDA  
N. de Registro: 15256 / RG 25122  
Fecha: 06/11/2017 10:50:04

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8  
28022 MADRID





DEPARTAMENTO  
DE MEDICAMENTOS  
DE USO HUMANO

**ASUNTO:** RESOLUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO CLÍNICO O EPIDEMIOLÓGICO

**DESTINATARIO:** D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> PILAR BALLESTER FERRÉ

Vista la solicitud-propuesta formulada con fecha **30 de octubre de 2017**, por D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> PILAR BALLESTER FERRÉ, para la clasificación del estudio titulado **“Caracterización del deterioro neurológico y la respuesta al tratamiento con Rifaximina en pacientes con cirrosis hepática y encefalopatía hepática mínima.”** con código **SER-HEP-2017-05**, y cuyo promotor es **M<sup>a</sup> Desamparados Escudero García**, se emite resolución.

El Departamento de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), de conformidad con los preceptos aplicables, <sup>(1)</sup> **RESUELVE** clasificar el estudio citado anteriormente como **“Estudio Posautorización de seguimiento prospectivo** (abreviado como EPA-SP).

El promotor del estudio deberá remitir solicitud de autorización del mismo <sup>(2)</sup> a todas aquellas Comunidades Autónomas en las que se pretenda llevar a cabo, incluyendo la siguiente documentación (una copia en papel y otra en formato electrónico).

- Carta de presentación dirigida a los responsables de esta materia en la Comunidad Autónoma<sup>(3)</sup> en la que se solicite la autorización del estudio e indique la dirección y contacto del solicitante y la relación de documentos que se incluyen<sup>(4)</sup>.
- Resolución de la AEMPS sobre la clasificación del estudio
- Protocolo completo, incluidos los anexos, y donde conste el número de pacientes que se pretenden incluir en España, desglosado por Comunidad Autónoma.
- Dictamen favorable del estudio por un CEIC acreditado en España.
- Listado de Centros Sanitarios donde se pretende realizar el estudio, desglosado por Comunidad Autónoma
- Listado de investigadores participantes en la Comunidad Autónoma.
- Si el estudio se pretende realizar en otros países, situación del mismo en éstos
- Documento acreditativo de haber satisfecho las tasas correspondientes, en aquellas CC.AA. donde se exijan.

CORREO ELECTRÓNICO

farmacoepi@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8  
28022 MADRID



DEPARTAMENTO  
DE MEDICAMENTOS  
DE USO HUMANO

El plazo máximo establecido para emitir resolución por parte de cada CC.AA. será de 90 días naturales. Si transcurrido el mismo la CC.AA. no se hubiese pronunciado, se entenderá autorizado el estudio en esa CC.AA.

Contra la presente resolución que pone fin a la vía administrativa podrá interponerse Recurso Potestativo de Reposición, ante la Directora de la Agencia, en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente a aquel en que tenga lugar la notificación de la presente resolución. <sup>(5)</sup>

Madrid, a 31 de octubre de 2017

EL JEFE DE DEPARTAMENTO DE  
MEDICAMENTOS DE USO HUMANO

César Hernández García

<sup>1</sup> Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas; la Ley 14/2000, de 29 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y de orden social; Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios; Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos; el Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal "Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios" y se aprueba su estatuto; el Real Decreto 577/2013, de 26 de julio, por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios posautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano.

<sup>2</sup> De acuerdo con la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre.

<sup>3</sup> Directorio disponible en la página web de la AEMPS (<http://www.aemps.es/actividad/invClinica/estudiosPostautorizacion.htm>)

<sup>4</sup> En el caso de que el promotor no sea quien presente la documentación, se deberá incluir en la misma un documento que indique las responsabilidades delegadas por el promotor a la persona o empresa que actúa en su nombre.

<sup>5</sup> De conformidad con lo dispuesto en la Ley 39/2015, de 1 de octubre, o Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses contados desde el día siguiente al de la notificación de la presente resolución, de conformidad con la Ley 29/1998, de 13 de Julio, reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa, sin perjuicio de poder ejercitar cualquier otro recurso que se estime oportuno. En caso de interponerse recurso de reposición no podrá interponerse recurso contencioso-administrativo hasta la resolución expresa o presunta del primero.

CORREO ELECTRÓNICO

farmacoepl@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8  
28022 MADRID