

Programa de  
Doctorado en  
Neurociencias

# Caracterización de las alteraciones en el inmunofenotipo asociadas a la aparición de la encefalopatía hepática mínima en pacientes cirróticos. Implicación de las vesículas extracelulares.



Tesis doctoral

Autor: **Juan José Gallego Roig**

Directores

**Carmina Montoliu Félix**  
**Francisco Javier Megias Vericat**

Julio de 2023





**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA –**  
**INCLIVA**

Programa de Doctorado en Neurociencias



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

**INCLIVA | VLC**  
Instituto de Investigación Sanitaria

---

**Caracterización de las alteraciones en el  
inmunofenotipo asociadas a la aparición de la  
encefalopatía hepática mínima en pacientes  
cirróticos. Implicación de las vesículas  
extracelulares**

---

Tesis doctoral

**Autor:** Juan José Gallego Roig

**Directores:**

Carmina Montoliu Félix

Francisco Javier Megias Vericat

Valencia, julio de 2023





VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

**INCLIVA | VLC**  
Instituto de Investigación Sanitaria

## INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL

Los Directores,

- 1- Carmina Montoliu Félix, Dra. en Biología, Investigadora Principal del Laboratorio de Deterioro Neurológico de la UV/INCLIVA y Profesora Titular del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia.
- 2- Francisco Javier Megias Vericat, Dr. en Farmacia y Profesor Titular del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

Los Directores certifican que el estudiante del Programa de Doctorado en Neurociencias de la Universidad de Valencia, Juan José Gallego Roig, realizó bajo su supervisión la Tesis Doctoral Titulada: “Caracterización de las alteraciones en el inmunofenotipo asociadas a la aparición de la encefalopatía hepática mínima en pacientes cirróticos. Implicación de las vesículas extracelulares”, en el Laboratorio de Deterioro Neurológico de la UV/INCLIVA.

Tras la revisión del manuscrito, emiten su informe FAVORABLE para el depósito y defensa de la tesis doctoral.

Valencia, 26 de julio de 2023

MARIA DEL  
CARMEN|  
MONTOLIU  
|FELIX

Firmado digitalmente por  
MARIA DEL  
CARMEN|  
MONTOLIU|FELIX  
Fecha: 2023.07.26  
11:43:50 +02'00'

FRANCISCO  
JAVIER|  
MEGIAS|  
VERICAT

Firmado digitalmente por  
FRANCISCO JAVIER|MEGIAS|  
VERICAT  
Nombre de reconocimiento (DN):  
cn=FRANCISCO JAVIER|MEGIAS|  
VERICAT,  
serialNumber=44867703Q,  
givenName=FRANCISCO JAVIER,  
sn=MEGIAS VERICAT,  
ou=CIUDADANOS, o=ACCV, c=ES  
Fecha: 2023.07.26 11:50:33 +02'00'

Fdo.: Carmina Montoliu Félix  
[Carmina.Montoliu@uv.es](mailto:Carmina.Montoliu@uv.es)

Fdo.: Francisco Javier Megias Vericat  
[Javier.Megias@uv.es](mailto:Javier.Megias@uv.es)



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, querría agradecer a mis directores de tesis, Carmina y Javier, por haber hecho posible la realización de este trabajo. A Carmina por permitirme realizar la tesis doctoral en el Laboratorio de Deterioro Neurológico, por dirigirme a lo largo de estos y por transmitirme aún más ilusión por la ciencia. A Javier por la motivación y apoyo recibido, así como por la paciencia al revisar tan detenidamente todas las versiones de esta tesis.

Agradecer también a todos mis compañeros del Laboratorio de Deterioro Neurológico. A Amparo, por estar siempre dispuesta a enseñarme todo lo que sabes, por recordarme todo lo que tenía que hacer, por ser mi libro de referencia para todos los análisis estadísticos y por ser parte de todo el trabajo que he desarrollado, los dos sabemos que esta tesis tampoco hubiera sido posible sin ti. A Alessandra y Franc, mis compañeros de doctorado. Alessandra, te convertiste pronto en un pilar fundamental en lo laboral y en lo personal, no olvidaré las tardes frente al ordenador comentando cada resultado que obteníamos y compartiendo quejas, penas, alegrías y cafés, sobre todos cafés; pensábamos que el día en el que acabáramos la tesis no llegaría nunca, pero aquí estamos, dando este paso juntos, no podría haber un final mejor, *grazie mille*. A Franc, el bioinformático del laboratorio, el que todo lo arregla con R, ha sido un placer compartir tiempo contigo. Mención especial también a Alejandra, Clara, Olga y Alberto, que los considero amigos más que compañeros de trabajo. A Alejandra, nuestra reina de los blots, por animar el laboratorio y por hacer posible parte de los resultados de mi tesis. A Clara, que llegaste al laboratorio mientras aún estabas estudiando y te hemos visto aprender hasta hacerte imprescindible, además de compartir alguna cervecita después del trabajo. A Olga, que nos conocimos en el laboratorio, pero luego hemos compartido más momento fuera de él, sobre todo durante los tres meses de mi estancia en Londres, donde no hubiera sobrevivido sin ti. Alberto, aunque te nombre de los últimos, eso no te quita protagonismo, fuiste un gran apoyo al principio de este viaje, el que me acogió a mi llegada al laboratorio y me enseñó a procesar la sangre, hacer los ELISAS y tomarme las cosas en su justa medida, gracias por aquellos buenos inicios. También quisiera agradecer a todos los compañeros que han pasado por el laboratorio durante mis años de doctorado, Andrea, Carla, Juanjo, Laura, Christian, etc., gracias a todos, hemos hecho un gran equipo.

También toca agradecer la colaboración de los médicos especialistas de los Servicios de Medicina Digestiva del Hospital Clínico y del Hospital Arnau de Vilanova, así como a los

enfermeros del Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Clínico, en especial a Nuria, Machús y Mateo, por la paciencia que han tenido con nosotros para las extracciones de sangre que nos permiten realizar nuestros estudios. También debo agradecer la colaboración de todos aquellos pacientes y controles que participan en este y otros estudios, ya que, sin su disposición, estos proyectos no serían posibles.

En esta tesis también ha colaborado mi gente más cercana, aunque sea de forma indirecta, apoyándome, animándome y dándome fuerzas en los momentos más duros. Me gustaría, y debo, empezar estos agradecimientos con mis padres, Juan y Carmen, mejor conocidos en el laboratorio como CR230 y CR231 respectivamente. Ellos son los que han confiado en mí y en mis capacidades desde el inicio, desde el instituto me animaban a seguir estudiando, a mantener la curiosidad por la biología y a que eligiera la carrera que más me motivara. A ellos debo agradecerles toda mi trayectoria en la ciencia y que hayan sido, y sean, mis directores de vida. Al resto de mi familia, mi hermana Lidia, mi tía, mis primos, etc., unas simples palabras de ánimos los domingos de paella hacían mucho en mí. Mis amigos también han sido parte fundamental en este viaje, con ellos he compartido lo bueno y lo malo de estos años, se han interesado por mi investigación y me han dado soporte cuando los ánimos estaban bajo. A mis amigos de toda la vida: Roberto A, Roberto B, Paula, Sergio, Juandi, Marina, etc., solo con vuestra compañía ya era suficiente para distraerme un fin de semana y hacer que el lunes estuviera a tope en el laboratorio, gracias de corazón, no sabéis cuanto ayuda esto a la investigación. Agradecer también a Rodrigo, nuestra amistad empezó cuando empezó esta tesis, así que has tenido que sufrirla desde el principio; gracias por aguantar mis momentos de apatía y de efusividad por la ciencia, por hacer la cena cuando estaba saturado con la tesis y por el diseño gráfico de mis seminarios y de la portada de esta tesis. Gracias también a mis amigos de la biología, con los que compartí el día a día de la carrera.

Por último, agradecer a la Dra. Margarita Domínguez Villar por permitirme realizar una estancia en su laboratorio en el *Imperial College London*. A ella y a todo su equipo tengo que agradecerles que me acogieran como uno más del laboratorio, incluyéndome en seminarios, reuniones semanales y enseñándome todo lo que estaba a su alcance.

Estos años han sido una montaña rusa de emociones. El doctorado es un trayecto duro, pero hay muchos otros momentos que lo compensan. No quisiera olvidarme de nadie en estos agradecimientos, gente que me ha acompañado en esta aventura, tanto a nivel personal como profesional. Por ello, una vez más ¡MIL GRACIAS!







*A mis padres,  
familia y amigos*

“La ciencia siempre vale la pena, porque sus descubrimientos,  
tarde o temprano, siempre se aplican”

**Severo Ochoa**



# ÍNDICE

<b>I. SUMMARY</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	49
<b>1. Cirrosis hepática</b> .....	51
1.1. Epidemiología y etiología .....	51
1.2. Fisiopatología.....	52
1.3. Características clínicas .....	53
1.3.1. Clasificación.....	53
1.3.2. Hiperamonemia .....	54
1.3.3. Inflamación .....	55
1.3.4. Translocación bacteriana.....	55
<b>2. Encefalopatía hepática</b> .....	56
2.1. Manifestaciones clínicas de la encefalopatía hepática mínima.....	57
2.2. Clasificación.....	57
2.2.1. Según su origen .....	57
2.2.2. Según la recurrencia de los episodios .....	58
2.2.3. Según la existencia de factores precipitantes .....	58
2.2.4. Según la severidad de sus manifestaciones .....	58
2.3. Diagnóstico .....	60
<b>3. Encefalopatía hepática mínima</b> .....	61
3.1. Diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima.....	61
3.2. Hiperamonemia .....	63
3.3. Inflamación .....	64
3.4. Efecto sinérgico de la hiperamonemia e inflamación en la inducción de la encefalopatía hepática mínima.....	65
3.5. Neuroinflamación y encefalopatía hepática .....	67
3.6. Alteraciones en la neurotransmisión y encefalopatía hepática .....	68
<b>4. El sistema inmunitario</b> .....	69
4.1. Respuesta inmunitaria .....	70

4.1.1.	Respuesta innata.....	70
4.1.2.	Respuesta adaptativa .....	71
4.1.3.	Respuesta humoral y linfocitos B .....	72
4.1.4.	Respuesta celular y linfocitos T .....	74
4.1.5.	Subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	75
4.2.	Mediadores de la inflamación .....	80
4.2.1.	Regulación de la expresión de citocinas: papel de TTP y A20.....	83
4.3.	Activación del sistema inmunitario.....	85
4.4.	Alteraciones del sistema inmunitario en pacientes con encefalopatía hepática mínima .....	86
<b>5.</b>	<b>Vesículas extracelulares .....</b>	<b>89</b>
5.1.	Biogénesis y liberación de las vesículas extracelulares .....	90
5.2.	Funciones de las vesículas extracelulares. Comunicación intercelular.....	92
5.2.1.	Vesículas extracelulares y sistema inmunitario .....	94
5.2.2.	Vesículas extracelulares e infecciones víricas y bacterianas .....	98
5.2.3.	Vesículas extracelulares y cáncer.....	99
5.3.	Vesículas extracelulares y sistema nervioso central .....	100
5.3.1.	Impacto de la inflamación periférica en el sistema nervioso central mediado por vesículas extracelulares.....	101
5.3.2.	Vesículas extracelulares en modelos de encefalopatía hepática .....	102
5.3.3.	Aplicación en diagnóstico .....	103
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>107</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>111</b>
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>115</b>
<b>1.</b>	<b>Pacientes y controles.....</b>	<b>117</b>
1.1.	Criterios de inclusión y exclusión.....	117
1.2.	Extracción de sangre .....	117
<b>2.</b>	<b>Determinación de los niveles de amonio en sangre.....</b>	<b>118</b>
<b>3.</b>	<b>Obtención de muestras de suero y plasma .....</b>	<b>119</b>
<b>4.</b>	<b>Test psicométricos .....</b>	<b>119</b>
4.1.	Clasificación de los pacientes mediante la batería PHES .....	120

4.1.1.	Test de dígitos y símbolos.....	120
4.1.2.	Test de conexión numérica A.....	120
4.1.3.	Test de conexión numérica B.....	120
4.1.4.	Test de puntos seriados.....	121
4.1.5.	Test de línea quebrada.....	121
4.1.6.	Cálculo de la puntuación PHES.....	121
4.2	Estudio de alteraciones cognitivas mediante test psicométricos.....	122
4.2.1.	Test Stroop.....	122
4.2.2.	Test oral de claves.....	124
4.2.3.	Test oral de dígitos.....	124
4.2.4.	Test oral de letras y números.....	125
4.2.5.	Test d2.....	126
<b>4.3.</b>	<b>Estudio de alteraciones motoras.....</b>	<b>127</b>
4.3.1.	Test de coordinación bimanual.....	127
4.3.2.	Test de coordinación visuo-motora.....	128
<b>5.</b>	<b>Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....</b>	<b>129</b>
<b>6.</b>	<b>Estudio de subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo.....</b>	<b>131</b>
6.1.	Estudio de linfocitos B en sangre total por citometría de flujo.....	131
6.2.	Estudio de subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> en PBMC por citometría de flujo.....	135
6.2.1.	Linfocitos Th1, Th2, Th9, Thf y Th22.....	135
6.2.2.	Linfocitos Th17 y Tregs.....	138
<b>7.</b>	<b>Medida de citocinas mediante <i>ELISA</i>.....</b>	<b>140</b>
<b>8.</b>	<b>Medida de IL-17 en plasma mediante Simoa®.....</b>	<b>143</b>
<b>9.</b>	<b>Aislamiento de vesículas extracelulares a partir de plasma por cromatografía de exclusión por tamaño.....</b>	<b>144</b>
9.1.	Separación de vesículas extracelulares a partir de plasma.....	145
9.2.	Análisis de rastreo de nanopartículas.....	146
9.3.	Microscopía electrónica de transmisión.....	147
<b>10.</b>	<b>Estudio del contenido proteico en vesículas extracelulares mediante <i>western blot</i>.....</b>	<b>147</b>
<b>11.</b>	<b>Estudio del contenido de TGF-β en vesículas extracelulares mediante <i>ELISA</i>....</b>	<b>150</b>
<b>12.</b>	<b>Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> a partir de PBMC congeladas.....</b>	<b>151</b>

<b>13. Estudio del efecto de la adición de vesículas extracelulares a cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup></b> .....	153
13.1. Determinación de los niveles de citocinas en medio de cultivo .....	154
13.2. Medida de la expresión de factores de transcripción .....	155
13.2.1. Aislamiento del ARN total.....	155
13.2.2. Retrotranscripción .....	155
13.2.3. PCR cuantitativa.....	156
<b>14. Estudio de la expresión génica y el contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup></b> .....	157
14.1. Estudio del contenido proteico mediante <i>western blot</i> en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	157
14.2. Estudio de expresión génica mediante PCR cuantitativa en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	158
<b>15. Análisis estadístico</b> .....	158
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	161
<b>1. Clasificación y características de la cohorte de estudio</b> .....	163
1.1. Diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima mediante la batería PHES.....	163
1.2. Características de controles y pacientes.....	164
<b>2. Determinación de los niveles de amonio en sangre</b> .....	164
<b>3. Estudio de las alteraciones cognitivas</b> .....	165
3.1. Velocidad de procesamiento y atención selectiva: Test oral de claves.....	165
3.2. Flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada: Test Stroop..	166
3.3. Atención selectiva-sostenida y concentración: Test d2 .....	168
3.4. Memoria de trabajo: test oral de dígitos y test oral de letras y números.....	169
<b>4. Estudio de las alteraciones motoras</b> .....	170
<b>5. Estudio de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica</b> .....	171
5.1. Linfocitos B.....	172
5.1.1. Linfocitos B totales .....	172
5.1.2. Subpoblaciones de linfocitos B.....	172
5.1.3. Análisis de niveles de BAFF, APRIL, BDNF e IgA en plasma .....	174
5.2. Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	175
5.2.1. Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> totales .....	175
5.2.2. Subpoblaciones linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	176



5.2.3.	Análisis de los niveles de IL-17 en plasma.....	178
5.2.4.	Cociente Th1/Th2 y Th17/Tregs.....	179
<b>6.</b>	<b>Estudio de la expresión génica y del contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup> .....</b>	<b>179</b>
6.1.	Contenido proteico de glutaminasa en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	179
6.2.	Expresión génica de receptores de membrana en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	180
6.3.	Expresión génica y contenido proteico de citocinas en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	181
<b>7.</b>	<b>Estudio del contenido proteico en vesículas extracelulares aisladas de plasma ...</b>	<b>183</b>
7.1.	Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares .....	183
7.2.	Análisis de marcadores específicos de origen celular.....	187
7.3.	Análisis de moléculas implicadas en la presentación de antígenos .....	189
7.4.	Análisis de marcadores de inflamación en vesículas extracelulares.....	190
7.5.	Análisis de enzimas implicadas en el metabolismo del amonio .....	191
<b>8.</b>	<b>Estudio del efecto <i>in vitro</i> de vesículas extracelulares sobre cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> .....</b>	<b>192</b>
<b>9.</b>	<b>Análisis de correlación entre alteraciones cognitivas y motoras y parámetros inmunológicos estudiados y su capacidad predictiva .....</b>	<b>198</b>
9.1.	Correlación entre parámetros inmunológicos estudiados y alteraciones cognitivas y motoras.....	198
9.1.1.	Correlaciones con niveles de amonio en sangre .....	199
9.1.2.	Correlaciones con las poblaciones de linfocitos B y niveles de mediadores relacionados.....	200
9.1.3.	Correlaciones con las poblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y niveles de IL-17 en plasma.....	202
9.1.4.	Correlaciones con la expresión génica y contenido proteico en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	205
9.1.5.	Correlaciones con el contenido proteico en vesículas extracelulares .....	207
9.2.	Correlación entre parámetros inmunológicos estudiados .....	209
9.2.1.	Correlaciones entre parámetros del inmunofenotipo B y el inmunofenotipo T y contenido proteico en vesículas extracelulares.....	209
9.2.2.	Correlaciones entre parámetros de poblaciones del inmunofenotipo T ..	212
9.2.3.	Correlaciones entre marcadores de origen celular y el contenido de moléculas de interés en vesículas extracelulares .....	212
9.3.	Estudio de la capacidad predictiva de los parámetros analizados en el diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima .....	213

<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	217
<b>1. Diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima y caracterización de las alteraciones cognitivas y motoras asociadas</b> .....	219
1.1. Velocidad de procesamiento y atención selectiva.....	221
1.2. Flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada.....	222
1.3. Atención selectiva-sostenida y concentración .....	223
1.4. Memoria de trabajo .....	223
1.5. Coordinación motora.....	223
<b>2. Alteraciones en el inmunofenotipo de linfocitos B y linfocitos T CD4<sup>+</sup> en pacientes con encefalopatía hepática mínima</b> .....	224
<b>3. Estudio de los cambios en expresión génica y contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con encefalopatía hepática mínima</b> .....	230
<b>4. Papel de las vesículas extracelulares en los cambios asociados a la encefalopatía hepática mínima</b> .....	233
4.1. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas de plasma de pacientes con encefalopatía hepática mínima.....	234
4.2. Caracterización del origen celular de vesículas extracelulares de plasma de pacientes con encefalopatía hepática mínima .....	235
4.3. Caracterización de los cambios en el contenido proteico de vesículas extracelulares de plasma de pacientes con encefalopatía hepática mínima y su efecto sobre linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	238
<b>5. Valor diagnóstico de parámetros del inmunofenotipo y vesículas extracelulares en la encefalopatía hepática mínima</b> .....	242
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	245
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	249
<b>X. ANEXOS</b> .....	279





# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Escala Child-Pugh. Parámetros y rangos de puntuación .....	53
<b>Tabla 2.</b> Escala Child-Pugh. Puntuación y probabilidad de supervivencia .....	54
<b>Tabla 3.</b> Escala MELD. Puntuación y probabilidad de supervivencia.....	54
<b>Tabla 4.</b> Corrección por edad de los parámetros del test Stroop.....	123
<b>Tabla 5.</b> Combinación de anticuerpos utilizados en el estudio de linfocitos B en sangre total .....	132
<b>Tabla 6.</b> Combinación de anticuerpos utilizados en el estudio de subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> en PBMC .....	135
<b>Tabla 7.</b> Combinación de anticuerpos de superficie utilizados en el estudio de subpoblaciones de linfocitos Th17 y Tregs en PBMC .....	138
<b>Tabla 8.</b> Combinación de anticuerpos intracelulares utilizados en el estudio de subpoblaciones de linfocitos Th17 y Tregs en PBMC .....	139
<b>Tabla 9.</b> Kits ELISA comerciales .....	143
<b>Tabla 10.</b> Composición de las diferentes soluciones utilizadas en la separación y cuantificación de proteínas mediante <i>western blot</i> .....	149
<b>Tabla 11.</b> Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas .....	150
<b>Tabla 12.</b> Sondas Taqman™ (Applied Biosystems) del gen endógeno y los factores de transcripción característicos de subtipos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	157
<b>Tabla 13.</b> Proteínas analizadas y anticuerpos utilizados en el estudio de expresión proteica en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	158
<b>Tabla 14.</b> Sondas Taqman™ (Applied Biosystems) utilizadas en el estudio de expresión génica en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	158
<b>Tabla 15.</b> Características demográficas, etiológicas y severidad de la enfermedad hepática .....	164
<b>Tabla 16.</b> Alteraciones cognitivas y motoras. Se muestran los resultados obtenidos en los test psicométricos realizados .....	171
<b>Tabla 17.</b> Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos B.....	174
<b>Tabla 18.</b> Activación de subpoblaciones de linfocitos B .....	174
<b>Tabla 19.</b> Nivel de BAFF, APRIL, BDNF e IgA en plasma.....	175

<b>Tabla 20.</b> Porcentaje de subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	177
<b>Tabla 21.</b> Activación de subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	178
<b>Tabla 22.</b> Contenido proteico en VE. Marcadores de origen celular, moléculas implicadas en la presentación de antígenos, marcadores de inflamación y enzimas relacionadas con el metabolismo del amonio .....	192
<b>Tabla 23.</b> Nivel de citocinas a 24 horas y 5 días en el medio de cultivo de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de sujetos control incubados en presencia de VE .....	196
<b>Tabla 24.</b> Nivel de expresión de factores de transcripción en cultivos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de sujetos control en presencia de VE .....	198
<b>Tabla 25.</b> Correlaciones bivariadas de los niveles de amonio con los resultados de los test psicométricos realizados .....	199
<b>Tabla 26.</b> Correlaciones bivariadas entre las poblaciones de linfocitos B y los resultados de los test psicométricos realizados.....	201
<b>Tabla 27.</b> Correlaciones bivariadas entre la activación de las poblaciones de linfocitos B y sus mediadores con los resultados de los test psicométricos realizados .....	202
<b>Tabla 28.</b> Correlaciones bivariadas entre las poblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> e IL-17 con los resultados de los test psicométricos realizados .....	204
<b>Tabla 29.</b> Correlaciones bivariadas entre la expresión génica y el contenido proteico en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> con los resultados de los test psicométricos realizados.....	206
<b>Tabla 30.</b> Correlaciones bivariadas entre el contenido proteico de VE con los resultados de los test psicométricos realizados.....	208
<b>Tabla 31.</b> Correlaciones bivariadas entre el porcentaje, recuento y activación de poblaciones de linfocitos B con el porcentaje, recuento y activación de poblaciones de linfocitos T .....	210
<b>Tabla 32.</b> Correlaciones bivariadas entre el porcentaje, recuento y activación de poblaciones de linfocitos B con los niveles proteínas en plasma y contenido proteico en VE .....	211
<b>Tabla 33.</b> Correlaciones bivariadas entre el recuento y activación de poblaciones de linfocitos T con la activación de otras poblaciones de linfocitos T .....	212
<b>Tabla 34.</b> Correlaciones bivariadas entre el contenido proteico en VE de marcadores de origen celular y el contenido de moléculas de interés.....	213
<b>Tabla 35.</b> Curvas ROC de parámetros inmunológicos estudiados para evaluar su capacidad predictiva en el diagnóstico de la EHM .....	214
<b>Tabla 36.</b> Alteraciones cognitivas y motoras evaluadas mediante pruebas psicométricas comparando los tres grupos de estudio .....	221
<b>Tabla 37.</b> Alteraciones en el inmunofenotipo de linfocitos B comparando los tres grupos de estudio .....	226

<b>Tabla 38.</b> Alteraciones en el inmunofenotipo de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> comparando los tres grupos de estudio .....	228
<b>Tabla 39.</b> Cambios en la expresión génica y contenido proteico en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> comparando los grupos de estudio .....	231
<b>Tabla 40.</b> Cambios en el contenido proteico en VE aisladas de plasma comparando los tres grupos de estudio .....	236
<b>Tabla 41.</b> Efectos de la adición de VE aisladas de plasma de sujetos sanos, pacientes sin EHM y pacientes con EHM sobre cultivos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de controles.....	239





# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cambio porcentual de muertes a nivel mundial por cirrosis hepática y otras enfermedades hepáticas crónicas desde 1990 a 2017 (muertes cada 100.000 habitantes) .....	52
<b>Figura 2.</b> Fisiopatología de la fibrosis hepática .....	53
<b>Figura 3.</b> Reacciones de catalización de las enzimas glutamina sintetasa y glutaminasa .....	55
<b>Figura 4.</b> Clasificación de la EH en base a la severidad de los síntomas según A) criterios de West Haven y B) grados de la ISHEN .....	60
<b>Figura 5.</b> Vías de metabolismo de compuestos nitrogenados en cirrosis hepática .....	64
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo del efecto sinérgico de la hiperamonemia e inflamación en la inducción del deterioro cognitivo y motor en enfermedades hepáticas crónicas.....	67
<b>Figura 7.</b> Esquema de la presentación de antígenos, activación y diferenciación en linfocitos B y T .....	72
<b>Figura 8.</b> Subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	79
<b>Figura 9.</b> Esquema de las alteraciones en el sistema inmunitario asociadas a la EHM en pacientes cirróticos.....	88
<b>Figura 10.</b> Esquema de la biogénesis y liberación de las VE .....	92
<b>Figura 11.</b> Esquema de la internalización de las VE y su señalización en receptores de superficie de la célula diana.....	94
<b>Figura 12.</b> Procedimiento de medida de amonio en sangre total mediante aparato <i>Ammonia Checker II</i> (Arkray Factory, Inc) .....	119
<b>Figura 13.</b> Batería de test psicométricos PHES .....	122
<b>Figura 14.</b> Test Stroop .....	123
<b>Figura 15.</b> Test oral de claves .....	124
<b>Figura 16.</b> Test oral de dígitos .....	125
<b>Figura 17.</b> Test oral de letras y números.....	126
<b>Figura 18.</b> Test d2 .....	127
<b>Figura 19.</b> Test de coordinación motora .....	128
<b>Figura 20.</b> Gradiente de densidades creado con Lymphoprep™ y centrifugación para el aislamiento PBMC a partir de sangre total .....	129

<b>Figura 21.</b> Ejemplo de los pasos seguidos en el análisis de linfocitos B y la activación de las distintas poblaciones mediante el software <i>Kaluza</i> (Beckman Coulter).....	134
<b>Figura 22.</b> Ejemplo de los pasos seguidos en el análisis de linfocitos Th1, Th2, Th9, Thf y Th22 y la activación de las distintas poblaciones mediante el software <i>Kaluza</i> (Beckman Coulter) .....	137
<b>Figura 23.</b> Ejemplo de los pasos seguidos en el análisis de linfocitos Th17 y Tregs y la activación de las distintas poblaciones mediante el software <i>Kaluza</i> (Beckman Coulter)....	140
<b>Figura 24.</b> Esquema representativo del complejo anticuerpo de captura-citocina-anticuerpo de detección-estreptavidina en A) un ensayo ELISA convencional y B) un ELAST ELISA mediante la utilización del kit <i>ELAST® ELISA Amplification System</i> .....	142
<b>Figura 25.</b> Cromatografía de exclusión por tamaño .....	145
<b>Figura 26.</b> Esquema experimental de la separación de VE a partir de plasma mediante cromatografía de exclusión por tamaño .....	147
<b>Figura 27.</b> Esquema del aislamiento de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> mediante el kit comercial <i>EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit</i> (StemCell Technologies) de selección negativa .....	152
<b>Figura 28.</b> Comprobación de la pureza de la muestra de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> mediante citometría de flujo .....	152
<b>Figura 29.</b> Esquema experimental del estudio del efecto de la adición de VE sobre linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	154
<b>Figura 30.</b> Puntuación obtenida en la batería PHES y distribución de los grupos de pacientes. ....	163
<b>Figura 31.</b> Niveles de amonio en sangre en pacientes cirróticos y controles .....	165
<b>Figura 32.</b> Resultados obtenidos en el test oral de claves.....	166
<b>Figura 33.</b> Puntuaciones del test Stroop.....	167
<b>Figura 34.</b> Índice de efectividad (TOT) e índice de concentración (CON) obtenidos en el test d2.....	168
<b>Figura 35.</b> Respuestas correctas del test oral de dígitos y el test oral de letras y números... 169	
<b>Figura 36.</b> Resultados obtenidos en los test de coordinación bimanual y visuo-motora.....	170
<b>Figura 37.</b> Porcentaje y activación de linfocitos B totales.....	172
<b>Figura 38.</b> Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos B .....	173
<b>Figura 39.</b> Nivel de BAFF, APRIL, BDNF e IgA en plasma .....	175
<b>Figura 40.</b> Porcentaje y activación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> totales.....	176
<b>Figura 41.</b> Porcentaje de subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	177

<b>Figura 42.</b> Nivel de IL-17 en plasma .....	178
<b>Figura 43.</b> Cociente Th1/Th2 y Th17/Tregs .....	179
<b>Figura 44.</b> Contenido proteico de glutaminasa en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	180
<b>Figura 45.</b> Nivel de expresión de los receptores CCR2, CD86, TLR2 y TLR4 en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	181
<b>Figura 46.</b> Nivel de expresión de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	182
<b>Figura 47.</b> Contenido proteico de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TTP y A20 en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	183
<b>Figura 48.</b> Determinación de la concentración de partículas y ausencia de proteínas plasmáticas en las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión por tamaño.....	184
<b>Figura 49.</b> Confirmación de la presencia de VE aisladas de plasma .....	185
<b>Figura 50.</b> Membrana representativa de <i>western blot</i> para el análisis del contenido de calnexina en muestras de VE .....	185
<b>Figura 51.</b> Caracterización de las muestras de VE aisladas a partir de plasma .....	187
<b>Figura 52.</b> Contenido proteico de marcadores específicos de células inmunes en VE.....	188
<b>Figura 53.</b> Contenido proteico de marcadores específicos de células del SNC en VE.....	189
<b>Figura 54.</b> Contenido proteico de MHC I, MHC II y CD74 en VE.....	190
<b>Figura 55.</b> Contenido proteico en marcadores de inflamación en VE .....	191
<b>Figura 56.</b> Contenido proteico de enzimas del metabolismo del amonio en VE.....	191
<b>Figura 57.</b> Nivel de citocinas a 24 horas en el medio de cultivo de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> incubados en presencia de VE.....	194
<b>Figura 58.</b> Nivel de citocinas a 5 días en el medio de cultivo de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de sujetos control incubados en presencia de VE .....	195
<b>Figura 59.</b> Nivel de expresión de factores de transcripción en cultivos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de sujetos control incubados en presencia de VE .....	197



# ABREVIATURAS

A20	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> induced protein 3</i>
ADAM17	<i>A disintegrin and metalloprotease 17</i>
APC	Célula prestadora de antígeno
ARNm	ARN mensajero
AUC	<i>Area under the curve</i>
A $\beta$	$\beta$ -amiloide
BHE	Barrera hematoencefálica
BMEC	<i>Brain Microvascular Endothelial Cells</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cGAS-STING	<i>Cyclic GMP-AMP synthase stimulator of interferon genes</i>
C <sub>t</sub>	<i>Cycle threshold</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DST	<i>Digit Symbol Test</i>
EAE	Encefalomiелitis experimental autoinmune
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEG	Electroencefalograma
EEM	Error estándar de la media
EH	Encefalopatía hepática
EHM	Encefalopatía hepática mínima
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3 transcription factor</i>
FS	<i>Forward Scatter</i>
GAT3	Transportador de GABA 3
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HAND	Enfermedad neurocognitiva asociada a VIH
HCl	Ácido clorhídrico
HMGB1	<i>High mobility group box 1N</i>

HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
Hsp70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
IBA-1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule</i>
IC	Intervalo de confianza
IFN- $\gamma$	Inteferón gamma
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
IL-17R	Receptor de la IL-17
INR	Ratio internacional normalizado
ISHEN	<i>International Society of Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism</i>
L1CAM	Molécula de adhesión celular L1
LPS	Lipopolisacárido
LTT	<i>Line Tracking Test</i>
MELD	<i>Model for End Stage Liver Disease</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
miARN	MicroARN
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MMM	<i>Mismatch negativity</i>
MVB	<i>Multivesicular body</i>
NaCl	Cloruro sódico
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
NaOH	Hidróxido sódico
NCT-A	<i>Number Connection Test-A</i>
NCT-B	<i>Number Connection Test-B</i>
NF-L	Neurofilamento ligero
NK	Linfocitos <i>natural killer</i>
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF-B	Factor de crecimiento derivado de plaquetas-B
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>

PHES	<i>Psychometric Hepatic Encephalopathy Score</i>
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
RMf	Resonancia magnética funcional
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
SBF	Suero bovino fetal
SDT	<i>Serial Dotting Test</i>
SNC	Sistema nervioso central
SS	<i>Side Scatter</i>
TAR	<i>Trans-Activation Response</i>
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
Tc	T citotóxico
TCR	Receptor de linfocitos T
TEMs	<i>Tetraspanin-Enriched Membrane Domains</i>
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
Th	<i>T helper</i>
Thf	Linfocitos Th foliculares
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> induced protein 3</i>
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
Tregs	Linfocitos T reguladores
TSPO	<i>Translocator Protein</i>
TTP	<i>Tristetraprolin</i>
VEs	Vesículas extracelulares
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
ZFP36	<i>Zinc finger protein 36 homolog</i>





# **I. SUMMARY**



# INTRODUCTION

## 1. Liver cirrhosis

The liver is involved in a wide range of physiological processes, including macronutrient metabolism, regulation of blood volume, lipid homeostasis, support of the immune system, and degradation of toxic components, both of external and internal origin<sup>1</sup>. Liver cirrhosis is the final stage of liver damage caused by various mechanisms of inflammation and fibrogenesis, critical factors that lead to liver dysfunction and portal hypertension, resulting in increased resistance to blood flow and impaired liver function<sup>2-4</sup>.

## 2. Hepatic encephalopathy

Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neuropsychiatric syndrome characterized by functional impairment of the central nervous system (CNS) following liver failure. HE exhibits a wide spectrum of nonspecific neurological and psychiatric manifestations ranging from subclinical alterations to coma. These impairments negatively affect the patient's quality of life and lifespan and increase mortality rate<sup>5,6</sup>.

In its mildest form, only alterations related to orientation, attention, working memory, and psychomotor speed are present, along with abnormal results in clinical tests such as electroencephalography (EEG) and other functional brain assessments<sup>7</sup>. In later stages, personality changes such as apathy, irritability, and disinhibition occur. Sleep cycle disturbances, spatial-temporal disorientation, confusion states accompanied by periods of agitation and drowsiness, stupor, and coma are also observed<sup>5,8</sup>.

## 3. Minimal hepatic encephalopathy

Minimal hepatic encephalopathy (MHE) is the initial stage of HE and is considered the greatest risk factor for its development, increasing the risk of developing HE by up to 3.7 times in diagnosed with MHE<sup>9-11</sup>. In terms of survival of patients diagnosed with MHE, a prospective study determined that cirrhotic patients with MHE had a significantly lower survival rate compared to patients without MHE: 68.6% in patients with MHE *versus* 82% in patients without MHE<sup>12</sup>.

MHE does not present clinical symptoms and therefore is not detected in routine clinical examinations; therefore, it is diagnosed through neuropsychological and neurophysiological tests. MHE is characterized by cognitive and motor impairment, including alterations in

## *Summary*

cognitive and executive functions such as selective and sustained attention, visuospatial perception, and motor speed<sup>13-16</sup>. This impairment hinders daily tasks, reduces patients' quality of life and survival, and increases the number of falls and hospitalizations<sup>17-21</sup>. All these alterations make MHE an important health, social, and economic problem. Due to the subtle nature of these alterations, they are not detected in a routine clinical examination, and this condition remains undiagnosed and untreated. MHE is diagnosed in patients with liver damage after excluding HE or other kind of cognitive impairment associated with other pathologies<sup>7,9</sup>.

### **3.1. Diagnosis of minimal hepatic encephalopathy**

The key to diagnose MHE lies in discarding clinical signs of HE and conducting a neurological, cognitive, and motor evaluation of the patient using psychometric and neuropsychological tests. These tests are not specific to this condition, so it is important to perform them only in patients with severe liver disease who do not have factors that could alter the results, such as neurological diseases, medication, or alcohol consumption<sup>5</sup>. The most commonly used test for diagnosing MHE is the Psychometric Hepatic Encephalopathy Score (PHES) battery. At the 14th ISHEN Congress (2010), a consensus was reached that in multicenter studies diagnosing MHE, two tests should be used, with one of them being the PHES battery<sup>22</sup>. This battery consists of a set of five subtests administered on paper, which assess cognitive and motor functions. This is the reference test used in this study for diagnosing MHE in cirrhotic patients.

### **3.2. Hyperammonemia**

Ammonia ( $\text{NH}_4^+$ ) is an ion produced from the metabolism of proteins, nucleic acids, and other nitrogenous compounds. It is also an important component in the formation of biologically significant compounds such as glutamine and glutamate. The elimination of excess ammonia is largely carried out by its incorporation into the urea cycle in the liver and excretion through urine. In cirrhosis, hyperammonemia can lead to neural dysfunction, increased intracranial pressure, cerebral edema, and HE, making it a predominant risk factor for the development MHE<sup>23-25</sup>.

### **3.3. Inflammation**

Inflammation is a reaction that occurs in a tissue or organism in response to pathological agents, both of internal and external origin. This response can occur in the presence of external agents such as viruses, bacteria, parasites, fungi, toxic substances, radiation, or physical agents like extreme cold or heat, as well as internal agents such as tissue damage. It can also occur against healthy self-tissues in autoimmune diseases or due to hypersensitivity to external agents

(allergies), both of which are diseases related to abnormal functioning of the immune system. Various studies have suggested a relationship between inflammation and the progression and severity of MHE. Montoliu *et al.* indicated that levels of pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-6 and IL-18 are correlated with the severity of MHE, as patients with higher levels of these cytokines obtained lower scores in the PHES battery<sup>26</sup>. In other studies, levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) also correlated with the severity of HE<sup>27</sup>.

### **3.4. Synergistic effect of hyperammonemia and inflammation in the induction of minimal hepatic encephalopathy**

Ammonia levels are higher in cirrhotic patients with cognitive impairment, but this concentration does not correlate with the severity of HE. Instead, systemic inflammation appears to influence the severity of HE. These findings suggest that the concentration of ammonia *per se* would not trigger the development of MHE, but rather the combined effect of hyperammonemia and systemic inflammation would induce MHE. It has been described that patients with higher levels of inflammation show a more pronounced and rapid progression to HE<sup>28</sup>.

Felipo *et al.* conducted a study to evaluate the contribution of hyperammonemia and inflammation to cognitive impairment. They analyzed blood ammonia levels, levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-18, and the presence of cognitive impairment using the PHES battery in different pathologies associated with hyperammonemia and/or inflammation. The patient groups that exhibited cognitive impairment, as measured by the PHES battery, also had higher levels of ammonia and inflammation in their blood compared to healthy subjects or patients without cognitive impairment<sup>29</sup>.

These studies demonstrate that hyperammonemia and inflammation act synergistically in inducing cognitive impairment. If any of these parameters is within the normal range, cognitive impairment is not induced. The hypothesis proposed is that hepatic damage induces hyperammonemia and peripheral inflammation in patients, which can be transmitted to the brain, leading to neuroinflammation and alterations in neurotransmission. Ultimately, this results in the cognitive and motor impairments observed in MHE<sup>30</sup>.

## **4. Immune system**

The immune system is a complex network of cells, molecules, and tissues that work together to coordinate a response in order to protect the body against external aggressions, such as toxins

## Summary

or pathogens, as well as internal threats like tissue injuries or cancer. The effectiveness of this system relies on the specific recognition of these unwanted elements and the regulation of the immune response. Once the pathogen has been eliminated, the components of the immune system must return to a normal state. Failure in the immune system regulation can lead to an excessive and chronic response, resulting in pathological conditions that can damage tissues and organs<sup>31,32</sup>.

The immune response is based on two main pathways: the **innate response**, which is rapid and nonspecific, and the **adaptive response**, which exhibits a high degree of specificity against the external agent<sup>32,33</sup>. The cells involved in the adaptive response are T and B lymphocytes. Within the adaptive response, there are two types of responses: the **humoral response**, which is mediated by antibodies and **B lymphocytes**, and the **cellular response**, which is mediated by **T lymphocytes**. These two types of responses do not act independently, as B lymphocytes can present the antigen to T lymphocytes, and T lymphocytes can assist B lymphocytes in generating antibodies. The first step in the adaptive response, both humoral and cellular, is the recognition of the antigen by the receptors on T and B lymphocytes. B lymphocytes can recognize the free antigen through their receptor, while T lymphocytes require the antigen to be presented by antigen-presenting cells (APC). This recognition triggers the activation, proliferation, and differentiation of these lymphocytes. The specificity of this response is determined by the T cell receptor (TCR) on T lymphocytes and immunoglobulins (Ig), which acts as antigen receptors on B lymphocytes<sup>31,33</sup>.

TCR receptor is the receptor responsible for recognizing antigens presented by major histocompatibility complex (MHC) II molecules. Activation of this receptor will transduce signals, leading to the transcription of genes involved in cytokine release, cell division, and differentiation into effector cell subsets to combat the antigen<sup>34</sup>.

Within T cells, we find two predominant subtypes: T helper (Th) and T cytotoxic (Tc) lymphocytes, which express CD4 and CD8 molecules on their surface, respectively.

**CD8<sup>+</sup> T lymphocytes** are involved in immunity against viral infections and have antitumor activity. The cytotoxic action of Tc cells occurs after recognizing antigens presented by MHC I on the target cell.

**CD4<sup>+</sup> T lymphocytes** are responsible for orchestrating the immune response and activating other immune cells such as B lymphocytes. T cells, before being activated through antigen recognition, are considered naive CD4<sup>+</sup> T cells. Shortly after activation, they begin to

synthesize IL-2 and transform into a phenotype called Th0, from which they polarize into different effector subtypes depending on the cytokines and their concentrations present in the environment<sup>35</sup>.

#### 4.1. CD4<sup>+</sup> T lymphocytes subset

The different effector subset of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are Th1, Th2, Th17, Th follicular (Tfh), Th22, Th9, and regulatory T cells (Tregs).

**Th1 lymphocytes** are responsible for mediating the type 1 immune response, which protects against intracellular pathogens such as bacteria, viruses, and protozoa, by activating Tc cells and M1 macrophages<sup>36,37</sup>. They are induced in the presence of IL-12 and IFN- $\gamma$  and are characterized by the expression of the transcription factor TBX21. TBX21 inhibits the expression of GATA3 and RORC, characteristic transcription factors of Th2 and Th17 lymphocytes, respectively.

**Th2 cells** are responsible for mediating the type 2 immune response against extracellular infections<sup>38</sup>. The type 2 response also protects against parasites such as helminths by activating M2 macrophages and recruiting eosinophils, basophils, and mast cells to the site of infection. They are induced in the presence of IL-2 and IL-4 and are characterized by the expression of the transcription factor GATA3. GATA3 also inhibits the expression of TBX21 and RORC<sup>36,37</sup>. Th2 lymphocytes promote the humoral response by secreting IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)<sup>38</sup>.

**Th17 lymphocytes** are responsible for mediating the type 3 immune response to eliminate extracellular pathogens such as bacteria and fungi by participating in the recruitment of neutrophils and inducing the production and release of antimicrobial peptides by epithelial cells in the intestine, lungs, and skin<sup>39</sup>. They have also been implicated in inflammatory and autoimmune diseases such as multiple sclerosis, where their numbers are increased<sup>40,41</sup>. Th17 cells are induced in the presence of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, and low concentrations of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>42,43</sup>. They are characterized by the expression of the transcription factor RORC<sup>44</sup>. Products from extracellular bacteria and fungi activate APC to release IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-23, which induce the differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells into Th17 cells. Specifically, IL-6 and IL-23 can activate STAT3, which promotes the expression of RORC.

**Tfh lymphocytes** assist B cells in antibody production by promoting the formation of germinal centers, enhancing antibody affinity during maturation, and mediating isotype switching<sup>36</sup>.

## Summary

They are induced in the presence of IL-6 and IL-21 and are characterized by the expression of the transcription factor BCL6.

**Th22 cells** play an important role in mucosal and skin protection. They are induced in the presence of TNF- $\alpha$  and IL-6, with their differentiation being enhanced by IL-1 $\beta$  and inhibited by TGF- $\beta$ . They are characterized by the expression of the transcription factor AHR<sup>45,46</sup>. Th22 cells secrete IL-22 and TNF- $\alpha$ . Pathologically, IL-22 has been attributed a role in inflammatory skin diseases by synergistically acting with IL-17<sup>47,48</sup>, amplifying the effect of TNF- $\alpha$  in the pro-inflammatory environment during skin immunity<sup>49</sup>, or activating STAT3<sup>50</sup>. Like Th17 cells, Th22 lymphocytes have also been implicated in various inflammatory and autoimmune diseases<sup>46,51</sup>.

**Th9 lymphocytes** participate in immunity against helminths. They are induced in the presence of IL-2, IL-4, IL-1, and TGF- $\beta$ <sup>46,51</sup> and are characterized by the expression of the transcription factors PU.1 and IRF4, as well as the release of IL-9, their characteristic cytokine<sup>52-54</sup>. However, it has also been described that IL-9 can be released by other types of lymphocytes. The action of IL-9 has also been associated with autoimmune diseases, such as in an the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), where IL-9 mediates the pathological processes that occur<sup>55,56</sup>.

**Tregs cells** play an important role in restoring inflammatory parameters after the elimination of pathogens or damage, and in the prevention of autoimmune diseases<sup>36</sup>. These cells are characterized by the release of TGF- $\beta$  and IL-10 and the presence of CD25 molecules on their surface, as well as the expression of the transcription factor FOXP3<sup>57,58</sup>. They are induced in the presence of IL-2 and TGF- $\beta$ , which promotes the expression of FOXP3<sup>59-61</sup>. The regulatory function of these cells is carried out by secreting regulatory cytokines such as IL-10, IL-35, and TGF- $\beta$ , suppressing IL-2 which promotes the survival and proliferation of effector CD4<sup>+</sup> T cells, releasing perforin and granzyme B to eliminate activated APCs, and promoting the dissociation of the antigen-MHC II complex.

The imbalance in the Th17/Tregs ratio is one of the factors that triggers various autoimmune diseases such as Crohn's disease, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis<sup>62</sup>.

## 4.2. Inflammatory mediators

Cytokines are molecules able to modify cellular physiology by binding to their receptor in the target cell. This binding triggers an intracellular signal that modulates the expression pattern of



the target cell<sup>33</sup>. The function of these molecules is diverse and depends on the specific cytokine and the involved cell.

One of the most studied pro-inflammatory cytokines is **TNF- $\alpha$** , primarily produced by monocytes, macrophages, neutrophils, mast cells, endothelial cells, and T cells. TNF- $\alpha$  plays an important role in initiating inflammatory processes, increases the proliferation of T lymphocytes, and amplifies the release of other pro-inflammatory cytokines such as IL-6 or IL-1 $\beta$ <sup>63-65</sup>. This cytokine also induces the release of chemokines and adhesion molecules that promote the recruitment of leukocytes to inflamed tissues<sup>66</sup>.

**Interleukins** are cytokines produced by leukocytes, and their target cells are predominantly other immune system cells. Some of the interleukins analyzed in this study include IL-17, IL-21, IL-22, and IL-1 $\beta$ .

**IL-17** has been associated with various autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis<sup>67</sup>, systemic lupus erythematosus<sup>68</sup>, and multiple sclerosis<sup>69</sup>, where its serum levels are elevated. This interleukin acts on endothelial cells, macrophages, monocytes, and T cells, promoting the release of other pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ . In terms of neuroinflammation, it has been postulated that the initial cells to infiltrate the CNS during pathological states are Th17 cells, mediated by the interaction of IL-17 with the IL-17 receptor (IL-17R) on the blood-brain barrier (BBB) endothelial cells, leading to increased BBB permeability. Receptors for IL-17 and IL-22 have been detected in endothelial cells of active lesions in the brains of multiple sclerosis patients, whereas these receptors are not present in the BBB endothelium of healthy individuals, highlighting the role of these two cytokines in BBB disruption<sup>70</sup>. The action of IL-17 on BBB endothelial cells would disrupt their permeability by reducing tight junctions and generating reactive oxygen species, activating endothelial contractile machinery and creating pores for Th17 lymphocyte infiltration<sup>71,72</sup>. Infiltration of these cells has also been found in *post-mortem* brains of patients with liver disease. Specifically, it was observed that patients with mild non-alcoholic fatty liver disease already exhibited Th17 lymphocyte infiltration in meninges, and this infiltration increased with disease progression, extending to patients with cirrhosis and HE<sup>73</sup>.

**IL-21** is primarily produced by Thf cells. It can induce the expression of more IL-21 and IL-17 and promote the differentiation into Th17 phenotypes while inhibiting Tregs differentiation. IL-21 helps maintain and control the maturation of B cells in germinal centers.

## Summary

**IL-22** has a synergistic role with IL-17 and TNF- $\alpha$ . Like IL-17, IL-22 has been proposed to contribute to BBB disruption, facilitating the passage of cells expressing this cytokine<sup>70</sup>. It has been associated with autoimmune diseases such as Crohn's disease<sup>74</sup>, psoriasis<sup>75</sup>, and rheumatoid arthritis<sup>76</sup>.

**IL-1 $\beta$**  is primarily released by monocytes, macrophages, and dendritic cells, stimulated by the action of TNF- $\alpha$ , although it can also be released by CD4<sup>+</sup> T cells. This pro-inflammatory cytokine is involved in both innate and adaptive immune responses, but it is also implicated in the pathogenesis of inflammatory diseases such as arthritis, Crohn's disease, and ulcerative colitis<sup>77,78</sup>.

**Chemokines** are a group of cytokines that play a key role in the migration of immune cells and whose receptors are present in all leukocytes. These molecules are produced by most of cells in response to pro-inflammatory cytokines<sup>33</sup>. **CCL20** is a chemokine that attracts lymphocytes expressing its cell surface receptor, CCR6, such as Th17, Th22, and Th9 cells. This chemokine is induced by microbial antigens such as lipopolysaccharide (LPS) or other pro-inflammatory cytokines like TNF- $\alpha$ . CCL20 is constitutively expressed by epithelial cells in the skin, lungs, intestine, BBB, and choroid plexus epithelium; under normal conditions, its levels are low, but they increase in response to pro-inflammatory cytokines<sup>79</sup>. It has been proposed that the interaction between CCL20 and CCR6 is involved in the infiltration of T cells into the CNS through the choroid plexus. Studies by Reboldi *et al.* suggest that the induction of neuroinflammation in EAE is due to the infiltration of Th17 cells via the CCR6-CCL20 interaction, and that these cells promote the infiltration of other cells that do not express CCR6<sup>80</sup>. Arima *et al.* also demonstrated that the CCR6-CCL20 interaction mediates the infiltration of autoreactive T lymphocytes during EAE<sup>81</sup>.

**Growth factors** are molecules that control cell growth and tissue repair. These factors can also have anti-inflammatory functions, such as **TGF- $\beta$** , by controlling cell proliferation and differentiation. This cytokine also promotes differentiation into Th17 and Tregs depending on its concentration; an increase in this cytokine inhibits RORC expression while increasing FOXP3 expression. At low concentrations, in conjunction with IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-21, it promotes differentiation into Th17<sup>82</sup>.

### 4.2.1. Regulation of cytokine expression: role of TTP and A20

The synthesis of cytokines is highly regulated through various mechanisms, including ubiquitination processes, mRNA stabilization, phosphorylation, etc. Two proteins involved in

the regulation of pro-inflammatory cytokine synthesis and the signaling pathways they induce in target cells are TTP (tristetraprolin or zinc finger protein 36 homolog [ZFP36]) and A20 (or tumor necrosis factor- $\alpha$  induced protein 3 [TNFAIP3]).

**TTP** negatively regulates the translation of mRNA containing adenine-uracil-rich elements (AREs) in their 3' region by destabilizing and promoting their degradation<sup>83,84</sup>. This protein promotes the destabilization and degradation of various cytokine-associated mRNAs, leading to a reduction in their protein levels. Cytokines regulated by TTP include TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-6. Therefore, a decrease in TTP function results in increased translation of these cytokines<sup>85-90</sup>.

**A20** is a cytoplasmic protein that regulates different activities related to ubiquitination, which are essential for the regulation of NF- $\kappa$ B pathway activation<sup>91-94</sup>. Action of A20 is mediated by its deubiquitinase activity, as it binds to ubiquitin chains or inhibits the function of other enzymes with ubiquitin ligase activity. That action leads to modification of various molecules involved in the NF- $\kappa$ B signaling cascade and excessive intensity and duration of the NF- $\kappa$ B pathway have been associated with various inflammatory diseases in humans and animal models<sup>91,95-98</sup>. Alterations in A20 are associated with different inflammatory diseases<sup>99-107</sup>. Mice with reduced A20 function develop spontaneous inflammation and autoimmunity<sup>108,109</sup>, while patients with multiple sclerosis and Parkinson's disease show reduced expression of the gene encoding A20<sup>107,110</sup>.

### 4.3. Immune system activation

The speed and specificity of the adaptive immune response are achieved because, upon initial interaction with the antigen, T and B lymphocytes proliferate, carry out their function, and then most of them undergo apoptosis. However, some cells called memory cells persist. These memory cells survive after the elimination of the pathogen, and when they encounter the antigen again, they quickly activate and divide to confront it<sup>111</sup>.

**MHC I and the innate response:** MHC I is present on the surface of all nucleated cells. This molecule presents antigens synthesized by the cell itself, including self-antigens and antigens resulting from a viral infection. In normal cells, MHC I presents self-antigens, which serve as a recognition signal for the cell's health.

**APC, MHC II, and the adaptive response:** APC are capable of endocytosis, processing antigenic molecules, and displaying them on their surface associated with MHC II, recognized

## Summary

by the TCR-CD3 complex. CD4<sup>+</sup> T lymphocytes only recognize antigens presented by MHC II molecules. The presence of MHC II on the cell surface is limited to APC, but under conditions of inflammation, the stimulation of endothelial and epithelial cells with INF- $\gamma$  induces the production of MHC II<sup>31</sup>.

### **4.4. Immune system alterations in patients with minimal hepatic encephalopathy**

In a previous study, alterations in the immune system associated with MHE were characterized<sup>112</sup>. The main changes detected in these studies included an increase in the pro-inflammatory environment, characterized by elevated levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-21, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-22, and IL-15, as well as the chemokines CCL20, CXCL13, and CX3CL1 in the plasma of MHE patients. MHE patients also exhibited increased pro-inflammatory monocytes and memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, including autoreactive ones, which contribute to the induction and maintenance of the pro-inflammatory environment. Furthermore, an increase in the early activation marker CD69 was observed in total CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, autoreactive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, and B lymphocytes, indicating a higher level of activation in these cell types. Transcription factors characteristic of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets were analyzed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC from MHE patients showed higher expression levels of the transcription factors AHR and BCL6, characteristic of Th22 and Tfh lymphocytes, respectively. Possible mechanisms were proposed in this study to explain how changes in peripheral inflammation in MHE patients could contribute to the development of neurological alterations: 1) infiltration of autoreactive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes into the brain, leading to neuroinflammation and neurological impairment; 2) peripheral blood-derived cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 would activate their receptors on BBB endothelial cells, stimulating the release of inflammatory factors into the brain and causing neuroinflammation and neurological alterations; and 3) infiltration of Tfh lymphocytes and the formation of tertiary lymphoid organs together with B cell germinal centers would result in neurological alterations<sup>112</sup>.

## **5. Extracellular vesicles**

Extracellular vesicles (EV) are structures formed by a lipid bilayer that are generated by the most of cell types, both under normal and pathological conditions. They contain proteins such as cytokines, enzymes, surface proteins such as receptors or ligands, lipids, and various types of nucleic acids<sup>113</sup>. The composition of these EV varies depending on the physiological state

and cellular origin. Within EV, two types of vesicles can be found: ectosomes and exosomes. Ectosomes are generated directly at the plasma membrane to be released, with a size ranging from 50 to 1,000 nm. Exosomes are formed through a double invagination of the plasma membrane, processed intracellularly, and released. These structures have a size between 40 and 160 nm. It is the exosomes that have attracted significant interest and are the focus of this thesis.

### **5.1. Biogenesis and release of extracellular vesicles**

The process of exosome generation begins with the invagination of the plasma membrane, trapping membrane-bound proteins such as transmembrane proteins, surface proteins, or receptors, as well as soluble molecules from the extracellular space. This process forms an early endosome, whose contents are modified by the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, resulting in the formation of a late endosome. A second invagination in the late endosome creates intraluminal vesicles, which will be the future released exosomes, forming a multivesicular body (MVB). This second invagination traps cytoplasmic components and components sent by the Golgi apparatus inside the vesicles. As a result of this second invagination, the surface of exosomes contains proteins that were originally present on the cell surface, including surface markers of the originating cell<sup>114–116</sup>.

The release of exosomes into the extracellular space occurs through fusion of the MVB with the cell's plasma membrane. Due to the process of exosome formation, the double invagination, they carry molecules on their surface that were present on the surface of the cell that released them, allowing for determination of their origin<sup>117</sup>. Some of these origin markers include the L1 cell adhesion molecule (L1CAM) when derived from neurons<sup>118,119</sup>, CD3 for T lymphocytes, CD19 for B lymphocytes<sup>120</sup>, or CD41 for megakaryocytes and platelets<sup>121</sup>.

### **5.2. Functions of extracellular vesicles. Intercellular communication**

EV mediate intercellular communication and their functions are carried out through two main mechanisms<sup>116</sup>:

- 1) **Transferring information to the target cell by stimulating its surface receptors through ligands present on the surface of EV.** Stimulation of membrane receptors on the target cell activates intracellular signaling pathways. The ligands present in EV largely depend on the type and physiological state of the cell that generates them, such as MHC molecules present in EV derived from APC.

- 2) **Transferring information to the target cell by releasing proteins and nucleic acids into the interior of the target cell.** Internalization of the contents of EV into the target cell can occur through direct fusion of EV with the plasma membrane or through internalization via various endocytic mechanisms.

### 5.3. Extracellular vesicles and the immune system

EV can mediate both stimulatory and suppressive actions on the immune response, playing a dual role in autoimmune processes or infectious pathologies. The activation of immune cells regulates the release of exosomes, as the interaction of dendritic cells and B cells with T cells, as well as TCR activation in T cells, increases the release of exosomes by these immune cells<sup>122–124</sup>. Exosomes derived from dendritic cells present MHC class I and II on their surface, which bind to T cell receptors, inducing an adaptive immune response by activating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells<sup>125</sup>. Exosomes can also influence the balance between pro- and anti-inflammatory T cells, promoting differentiation towards Th17 and Th1 effector phenotypes or Th2 and Tregs phenotypes<sup>126</sup>.

The functions of exosomes in immune system regulation are carried out through: 1) transfer and presentation of peptide antigens, 2) transfer of DNA, 3) modulation of gene expression through RNA transfer, or 4) activation of signaling pathways in the target cell.

#### 5.3.1. Transfer and presentation of peptide antigens

There are different mechanisms by which EV participate in antigen presentation:

- In **direct antigen presentation**, EV derived from APC maintain MHC I and MHC II molecules on their surface, which can directly stimulate CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, respectively. However, the activation of T cells by these free EV is less efficient compared to APC, likely only able to stimulate memory cells<sup>127–129</sup>.
- During **indirect antigen presentation by antigen transfer**, EV carry antigens on their MHC complexes and are internalized by dendritic cells. Dendritic cells can degrade the MHC-antigen complex from EV and use it as an alternative source of antigen peptides to stimulate T cells by presenting the antigen peptides on their own MHC molecules<sup>130,131</sup>.
- In the mechanism of **indirect antigen presentation by transfer of the MHC-antigen complex**, EV are internalized, and their MHC-antigen complexes are presented on the

surface of APC, without the need for modification or *de novo* synthesis by the recipient cell<sup>132</sup>.

### **5.3.2. Transfer of DNA**

Cytosolic DNA is indicative of tumor processes or infection by intracellular viruses or bacteria. The cGAS-STING pathway detects DNA in the cytosol, and its activation leads to the expression of inflammatory genes and a type 1 response, resulting in the recruitment and differentiation of pro-inflammatory monocytes, cytokine release, recruitment of NK cells, activation of dendritic cells, and polarization of lymphocytes towards Th1 and Th17, all aimed at addressing the damage. Exosomes released by infected cells can transport DNA that activates the cGAS-STING pathway, leading to the activation of inflammatory cascades<sup>114</sup>.

### **5.3.3. Modulation of gene expression through RNA transfer**

EV can transport a variety of nucleic acids such as DNA, mRNA, and miRNA. Predominantly, EV contain functional miRNA, which can modulate gene expression in the target cell<sup>133,134</sup>. EV can occasionally transfer mRNA, but when they do, it is regulatory mRNA rather than for protein synthesis<sup>135</sup>.

### **5.3.4. Activation of signaling pathways in the target cell**

EV carry molecules on their surface or inside that can bind to surface or intracellular receptors of the target cell, activating different signaling pathways. Molecules from the TNF- $\alpha$  superfamily are preferably transported bound to the vesicle surface, preventing their degradation by surface proteases, increasing their local concentration in the extracellular environment, and favoring their biological function<sup>136,137</sup>. This VE TNF- $\alpha$  contributes to the pathogenesis of T cell-mediated rheumatoid arthritis<sup>138</sup>. The content of EV can also exert an anti-inflammatory effect. For example, Álvarez *et al.* demonstrated that TGF- $\beta$  contained in EV derived from endometrial mesenchymal stem cells was able to inhibit the generation of effector CD4<sup>+</sup> T cells after physiological activation of these cells, regulating their inflammatory state<sup>139</sup>.

## **5.4. Extracellular vesicles and the central nervous system**

EV functions in the CNS include cellular communication, as vehicles for the elimination of toxic or waste substances, promotion of neurite growth, neural survival, myelin sheath formation, and neurotransmission<sup>140</sup>. However, EV also play a role in the development or

## Summary

maintenance of pathological conditions in the CNS, including neuroinflammatory, neurological, or neurodegenerative diseases<sup>140</sup>.

### **5.4.1. Impact of peripheral inflammation on the central nervous system mediated by extracellular vesicles**

Some studies demonstrate that EV are able to cross the BBB and acting on specific cells<sup>141</sup>. Using a BBB model, Chen *et al.*<sup>142</sup> found that exosomes could passively diffuse through the BBB by the gaps between cells. Additionally, other mechanisms of BBB EV crossing involve endocytosis of exosomes by BBB epithelial cells, followed by active release through exocytosis on the other side. This transcellular route is the most relevant process for exosome passage through the BBB<sup>142</sup>. Moreover, increased BBB permeability caused by factors such as TNF- $\alpha$  or IL-17 leads to enhanced uptake of exosomes by BBB epithelial cells<sup>142,143</sup>.

### **5.4.2. Extracellular vesicles in hepatic encephalopathy models**

Studies have been conducted to analyze the role of EV in the mechanisms by which hyperammonemia induces changes in the brain<sup>144</sup> in an animal model of HE that closely replicates the alterations present in patients<sup>145</sup>.

EV from hyperammonemic rats contained higher levels of TNF- $\alpha$  and its receptor TNFR1, molecules involved in the mechanism that leads to motor incoordination due to neurotransmission impairment in the cerebellum of this animal model<sup>146</sup>. Injecting EV from hyperammonemic rats into control rats resulted in their ability to reach the CNS from peripheral blood, induce motor incoordination, and trigger neuroinflammation characterized by increased microglial activation in the molecular layer and white matter of the cerebellum, elevated NF- $\kappa$ B expression in microglia, astrocyte activation, and upregulation of neuroinflammation markers in the cerebellum, such as CD68, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ <sup>144</sup>. These studies suggest that EV transmit the necessary molecules to induce motor incoordination in hyperammonemia and MHE.

### **5.4.3. Application in diagnosis**

Exosomes are found in all biological fluids and are secreted by the majority of cells, making them an ideal element for studying minimally invasive liquid biopsies as they can be isolated from saliva, urine, or blood.

The composition of these structures is conditioned by the physiological state of the cell that originates them, which makes them a potential tool in the diagnosis and therapy of various



diseases<sup>114</sup>. The content of EV is related to the physiological state of the cell that originates them, so an alteration in that cell type will lead to an alteration in the content of the vesicles<sup>147</sup>.

The content of miRNAs in exosomes has been extensively studied as a biomarker for various diseases, particularly cancer, where a characteristic miRNA pattern has been found in these vesicles<sup>148</sup>.

There are studies where neuronal-derived EV were isolated and purified from plasma, and analysis of their content of proteins related to neural damage showed that neuronal-derived EV contained a higher amount of these proteins<sup>118,119</sup>. These studies support the potential use of EV as biomarkers for pathologies, with special interest in early diagnosis of CNS disorders, as the CNS is difficult to access and current methods such as lumbar puncture are highly invasive.

## **HYPOTHESIS**

Previous studies propose that cognitive impairment associated with MHE is caused by the synergistic interaction between hyperammonemia and peripheral inflammation. Hyperammonemia and peripheral inflammation can be transmitted to the brain, inducing neuroinflammation and alterations in neurotransmission, leading to mild cognitive impairment. The changes in the immune system and the mediators involved are not fully understood. One possible candidate that mediates these alterations are EV, which play a significant role in intercellular communication and are implicated in diseases characterized by peripheral inflammation and neuroinflammation, such as multiple sclerosis and Alzheimer's disease.

Based on these findings, the hypotheses proposed in this study are:

- 1) Alterations in the immunophenotype of T and B lymphocytes, as well as changes in their gene expression and protein content, could be responsible for peripheral inflammation and facilitate the induction of neuroinflammation.
- 2) The protein content in EV isolated from plasma MHE patients is altered and contributes to the changes in the immune system that trigger MHE.
- 3) Changes in the immunophenotype and content of EV could also serve as a promising biomarker for MHE, allowing for early diagnosis of the disease and improving its treatment.

## OBJECTIVE

The **objective** of this thesis is to investigate whether EV isolated from plasma of cirrhotic patients with MHE play a role in the induction of inflammation and cognitive impairments associated with MHE, as well as in the altered differentiation of CD4<sup>+</sup> T cell subtypes observed in these patients. A second **objective** is to characterize the changes in the immunophenotype of B and T lymphocytes, and in the gene and protein expression of CD4<sup>+</sup> T cells, and evaluate the role of these changes in the induction of peripheral inflammation associated with these patients.

### Specific Objectives:

- 1) Determine the prevalence of MHE and assess cognitive and motor impairments in patients with MHE using specific psychometric tests.
- 2) Characterize the changes in the proportions of B and CD4<sup>+</sup> T lymphocyte populations, including naive and effector phenotypes.
- 3) Characterize the gene expression of cytokines and inflammation-related receptors in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.
- 4) Isolate and characterize plasma-isolated EV from control subjects and cirrhotic patients without and with MHE:
  - Analysis of the cellular origin of EV using various markers for immune and neuronal cells.
  - Analysis of the protein content of EV examining molecules involved in immune system activation, inflammation, and ammonia metabolism.
- 5) Evaluate if EV isolated from plasma of MHE patients play a role in the induction of inflammation and differentiation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in MHE patients.
- 6) Correlate the studied immunological parameters with the cognitive and motor impairments associated with MHE.
- 7) Assess the utility of determining changes in the immunophenotype and protein content of EV isolated from plasma for the diagnosis of MHE.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **1. Patients and controls**

One hundred thirty-one patients with liver cirrhosis were consecutively recruited from the outpatient clinics at the Hospitals Clínico and Arnau de Vilanova of Valencia, Spain. The diagnosis of cirrhosis was based on clinical, biochemical, and ultrasonographic data. Forty-three healthy volunteers were also enrolled in the study once liver disease was discarded by clinical, analytical, and serological tests. All participants were included in the study after signing their written informed consent. The study protocols were approved by the Scientific and Ethical Committees of both hospitals. The procedures followed were in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. Exclusion criteria were: presenting cognitive impairment consequence of another neuropsychiatric pathology, overt HE, recent alcohol intake (<6 months), severe liver failure (MELD score > 25), and hepatocarcinoma.

### **2. Ammonia blood level measurement and obtaining plasma samples**

Ammonia levels were measured with 20  $\mu$ L of whole blood by Ammonia Checker II (Arkray Factory, Inc; Kyoto, Japan) immediately after blood collection. Blood samples were centrifuged 10 min at 1.700 g to obtain plasma samples, which were kept at 80 °C below zero until use.

### **3. Minimal hepatic encephalopathy diagnosis by PHES and psychometric test**

#### **3.1. Minimal hepatic encephalopathy diagnosis by PHES**

The PHES battery was used to diagnose MHE in cirrhotic patients. The control group also performed PHES battery to discard the presence of mild cognitive impairment measured by PHES. The PHES battery consists of 5 subtests that evaluate motor speed, visual perception, visuospatial orientation, concentration, attention, and to a lesser extent, memory. Good attention is required to perform this battery, which is why other tests evaluating attention were not included<sup>149</sup>. To obtain the PHES score, a web application was used: [http://www.redeh.org/TEST\\_phes.htm](http://www.redeh.org/TEST_phes.htm). In this application, the subject's age, years of education within the educational system, and the score obtained in each subtest are entered. Using age and education level as variables, and with reference values for the normal Spanish

## *Summary*

population<sup>150</sup>, each subtest is scored with integer numbers, either positive or negative, depending on the success in performing the test. The sum of these scores gives the PHES score, which has a cut-off point for the diagnosis of MHE: if  $\text{PHES} \leq -4$ , the patient is classified as patient with MHE<sup>19,149</sup>.

### **3.2. Stroop test**

The Stroop test consists of three tasks that evaluate selective attention, processing speed, and response inhibition systems<sup>151–153</sup>. The congruent task involves words that designate colors, and the subject has to read them; the neutral task consists of colored circles that the subject has to name; and the incongruent task includes words that designate colors but are written in a different ink color from what they represent, and the subject must say the color of the ink in which the word is written<sup>154</sup>. Each task has a time limit of 45 seconds. The scores for each task are corrected for age and then interpolated using tables of normality specific to the Spanish population to obtain the final score<sup>154,155</sup>.

### **3.3. SDMT (oral version)**

The SDMT allows evaluating selective attention and processing speed<sup>156</sup>. The subject is given a template with symbols, and they must verbally state the number associated with each symbol for 90 seconds, according to a reference table. The number of items completed, correct responses, and errors are recorded.

### **3.4. Digit span test and letter-number sequencing test**

These tests allow evaluating working memory<sup>157,158</sup>. The digit span test consists of two tasks: the forward and the backward task. In the forward task, the subject is presented with a series of numbers and must repeat them in the same order. In the backward task, the subject is presented with a series of numbers and must repeat them in reverse order. In the letter-number sequencing test, the subject is presented with a series of numbers and letters and must repeat them in a specific order: first, the numbers in ascending order, and then the letters in alphabetical order. The score for each test is the sum of correctly completed series, and the test concludes when the subject fails all series within a block.

### **3.5. d2 test**

This test allows evaluating sustained selective attention and mental concentration<sup>159–161</sup>. The template of this test consists of 14 rows with different items (d or p with 1, 2, 3, or 4 lines), and

the subject has 20 seconds per row to mark the relevant items (d with two lines) while ignoring the rest of the items. Several parameters are obtained: total processed items (TR), total relevant items marked (TA), relevant items not marked (O), and non-relevant items marked (C). From these parameters, the effectiveness index (TOT) is calculated ( $TOT = TR - (O + C)$ ), which measures sustained selective attention; and the concentration index (CON) is calculated ( $CON = TA - C$ ), which measures concentration.

### **3.6. Bimanual and the visuo-motor coordination test**

These tests evaluate motor coordination in different aspects. The bimanual coordination test and the visuomotor coordination test were performed as described in Yela (1995)<sup>162</sup> and Yela and Ladrón (1995)<sup>163</sup>, respectively. In both tests, the time taken by the subject to complete the task is recorded.

## **4. Isolation of peripheral blood mononuclear cells**

PBMC were isolated from whole blood using density gradient centrifugation with Lymphoprep™ (Palex Medical SA; Barcelona, Spain). Briefly, whole blood was mixed in a 1:1 ratio with 0.9% NaCl; 2 volumes of this mixture were layered onto 1 volume of Lymphoprep™ (Palex Medical SA) and centrifuged for 30 minutes at 800 g without brake or acceleration. This centrifugation separated the PBMC, erythrocytes, and plasma diluted 1:1 in 0.9% NaCl; the diluted plasma was stored at 80°C below zero until use for EV isolation. The PBMC were washed with PBS (Biowest; Newry and Mourne, United Kingdom), and cell counting was performed using a Neubauer counting chamber (Marienfeld Superior; Lauda-Königshofen, Germany) in a Leica DM IL LED inverted phase-contrast microscope (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany). Three million PBMC were destined for the study of T CD4<sup>+</sup> lymphocyte subsets using flow cytometry. Cryopreservation of PBMC was performed in a mixture of inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco; Waltham, United States) and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, United States) gradually using a Mr. Frosty freezing container (Nalgene; Waltham, United States).

## **5. Study of lymphocyte subsets by flow cytometry**

Data acquisition was performed using the Gallios flow cytometer (Beckman Coulter; Brea, California, United States) from the Cytomics Service at the University of Valencia. Data analysis was carried out using the Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter).

## **5.1. Study of B lymphocytes in whole blood by flow cytometry**

For the study of B lymphocyte subpopulations, 100  $\mu$ L of whole blood obtained in BD Vacutainer® tubes with EDTA (BD Biosciences) and was incubated for 20 minutes in the dark at room temperature with the following antibodies (dilution, fluorochrome, commercial source): CD45 (1:20, KO, Beckman Coulter), CD19 (1:20, ECD, Beckman Coulter), CD27 (1:40, PE/Cy7, Biolegend), CD38 (1:40, APC/Fire™750, Biolegend), IgM (1:20, PB, Beckman Coulter), IgD (1:40, FITC, Biolegend), and CD69 (1:20, PE, Biolegend). After incubation with the antibodies, the cells were washed, and the erythrocytes were lysed with BD FACS Lysing Solution 1x (BD Biosciences) for analysis by flow cytometry. For the analysis, individual cells that have passed through the cytometer were selected, and leukocytes were identified as CD45<sup>+</sup> cells, within which lymphocytes were discriminated based on morphology. This population were further gated on CD19 to obtain B lymphocytes as CD19<sup>+</sup> cells. Within this population of B lymphocytes, several subpopulations of interest were identified: Plasmablasts (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>high</sup>/CD38<sup>+</sup>), immature B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>/CD38<sup>+</sup>), transitional B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>/CD38<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>), mature B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>/CD38<sup>-</sup>), naive B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/IgD<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>), memory B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD27<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>), unswitched B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>) and switched B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD27<sup>+</sup>/IgM<sup>-</sup>/IgD<sup>-</sup>) and double negative switched B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD27<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>/IgD<sup>-</sup>). Once the populations were identified, each one were gated to the early activation marker CD69 to obtain the percentage of activated cells in each population (CD69<sup>+</sup> cells within each population).

## **5.2. Study of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subpopulations in PBMC by flow cytometry**

The study of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets was performed on PBMC samples isolated on the same day the patient's blood was obtained. The reason for using this type of sample is that the study populations are more concentrated than in whole blood, allowing for better detection by flow cytometry.

### **5.2.1. Th1, Th2, Th9, Thf, and Th22 lymphocytes**

For these analyses, 300,000 PBMC were used, and dead cells were excluded from the analysis using the Zombie Violet™ Fixable Viability Kit (Biolegend). After incubation with Zombie Violet™ and washing the cells, they were incubated with the following antibodies (dilution,

fluorochrome, commercial source): CD4 (1:25, ECD, Beckman Coulter), CXCR5 (1:40, Alexa Fluor 700, Biolegend), CXCR3 (1:10, VioBright FITC, Miltenyi Biotec), CCR4 (1:10, PE Vio 770, Miltenyi Biotec), CCR6 (1:50, Brilliant Violet 510, Biolegend), CCR10 (1:10, PE, Miltenyi Biotec), CD69 (1:50, APC Vio770, Miltenyi Biotec). After incubation with the antibodies, the cells were washed, the erythrocytes were lysed with VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter), and then fixed with IOTest 3 Lysing Solution (Beckman Coulter) for analysis by flow cytometry. For the analysis, individual cells that have passed through the cytometer were selected, and the lymphocyte population were established based on morphology. Within this population, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were determined as cells positive for the CD4 marker. From the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, several populations of interest were identified based on combinations of the markers used: Thf lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/CCR4<sup>-</sup>/CXCR3<sup>-</sup>/CXCR5<sup>+</sup>), Th1 lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/CCR4<sup>-</sup>/CXCR3<sup>+</sup>/CCR10<sup>-</sup>/CCR6<sup>-</sup>), Th9 lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/CCR4<sup>-</sup>/CCR6<sup>+</sup>), Th22 lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup>/CXCR3<sup>-</sup>/CCR10<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>), and Th2 lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup>/CXCR3<sup>-</sup>/CCR10<sup>-</sup>/CCR6<sup>-</sup>). Once the populations were identified, each one is gated to the early activation marker CD69 to obtain the percentage of activated cells in each population (CD69<sup>+</sup> cells within each population).

### 5.2.2. Th17 and Tregs lymphocytes

For this study, two types of immunodetection were used: detection of surface cell markers, as described in section 5.2.1 of Materials and Methods, and detection of intracellular markers, molecules present inside the cell. For these analyses, 1,500,000 PBMC were used, and dead cells were excluded from the analysis using the Zombie Violet™ Fixable Viability Kit (Biolegend). After incubation with Zombie Violet™ and washing the cells, they were incubated with the following antibodies (dilution, fluorochrome, commercial source): CD4 (1:25, ECD, Beckman Coulter), CD25 (1:40, Brilliant Violet 510, Biolegend), and CD69 (1:50, APC Vio770, Miltenyi Biotec). After lysing the erythrocytes, the cells were washed, permeabilized, and fixed with 1x Human FoxP3 Buffer A (Human FoxP3 Buffer Set; BD Pharmingen) and incubated with the intracellular antibodies (dilution, fluorochrome, commercial source): IL17 (1:20, PE, Biolegend), and FOXP3 (1:5, Alexa Fluor 480, BD Pharmingen). For the analysis, individual cells that have passed through the cytometer were selected, and the lymphocyte population were established based on morphology. Within this population, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were determined as cells positive for the CD4 marker. From the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, two populations of interest were identified based on combinations of the markers used: Th17 lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/IL17<sup>+</sup>) and Tregs lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup>). Once the

populations were identified, each one were gated to the early activation marker CD69 to obtain the percentage of activated cells in each population (CD69<sup>+</sup> cells within each population).

## **6. Cytokine measurement by ELISA**

Cytokine concentrations were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ELISA kits used were the DuoSet ELISA Kit (R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, United States) for IL-17, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , CCL20, B-cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF), a proliferation-inducing ligand (APRIL), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The measurements were performed following the manufacturer's instructions. For the measurement of IgA, the Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, United States) was used. The measurements were performed following the manufacturer's instructions.

If the target molecule is present at low concentrations, an additional step can be performed to enhance the signal and improve detection. This amplification step can be carried out using the ELAST® ELISA Amplification System (Perkin Elmer; Waltham, Massachusetts, United States), following the manufacturer's instructions. This process is inserted right before adding the substrate reagent. Once this step is completed, the substrate solution is added to each well. The absorbance of the samples is read at 450 nm using a plate reader. The cytokine concentrations of each sample are interpolated from the absorbance values using a standard curve of known cytokine concentrations, expressed in pg/mL.

## **7. Plasma IL-17 measurement by Simoa®**

The measurement of IL-17 cytokine in plasma was performed using the ultrasensitive technology of Single Molecule Arrays (Simoa) (Quanterix; Billerica, Massachusetts, United States). This methodology provides higher sensitivity and allows for the quantification of molecules at very low concentrations that cannot be detected by a standard ELISA assay.

For the measurement of IL-17, the SIMOA HD-X Analyzer™ (Quanterix) instrument and the Simoa® IL-17A Advantage Kit (ref. 101599) (Quanterix) were used, following the manufacturer's instructions. The SIMOA HD-X Analyzer™ (Quanterix) instrument is fully automated and performs the steps, washes, incubations, and calculations of the experiment without the need for intervention, enhancing the reproducibility of the results.



## **8. Isolation of extracellular vesicles from plasma by size exclusion chromatography**

The isolation of EV from plasma was performed using size exclusion chromatography methodology with qEV columns (IZON Science; Christchurch, New Zealand). This method involves the use of columns containing a resin with pores of approximately 70 nm in size. Proteins and other small molecules pass through these pores and elute in later fractions, while EV, being larger in size, flow outside the resin and elute in earlier fractions. This allows the separation of EV from other plasma components. The plasma used for EV isolation was obtained after centrifugation using a density gradient with Lymphoprep™ (Palex Medical SA).

Plasma was thawed on ice and cell debris and large particles were removed by centrifuging the plasma at 1500 g for 10 min. Then, the samples were concentrated with Amicon® Ultra-4 centrifugal filter (Merck; Darmstadt, Germany) to 1 mL. Columns were equilibrated with 30 mL of 0.22- $\mu$ m-filtered PBS. Plasma (1 mL) was added into the column and 0.22- $\mu$ m-filtered PBS (Biowest) was added to the top of the column. Fractions 6 to 10 (500  $\mu$ L each) were collected and concentrated in an Amicon® Ultra (Merck) to 200  $\mu$ L. Sample protein quantification was performed by the colorimetric assay with bicinchoninic acid (BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), and the samples were stored at 80 °C below zero.

### **8.1. Nanoparticle tracking analysis**

The distribution profile, size, and quantity of EV were assessed by nanoparticle tracking analysis (NTA) with a NanoSight NS300 system (Malvern Panalytical; Malvern, United Kingdom). A 1:1000 dilution of the EV samples was used for NTA.

### **8.2. Transmission electron microscopy**

To confirm the presence of EV in the sample transmission electron microscopy was performed. Briefly, isolated EV were loaded onto carbon-coated copper grids and contrasted with 1% uranyl acetate. Samples were examined with a transmission electron microscope and images were acquired using a digital camera.

## **9. Study of the protein content in extracellular vesicles by western blot**

10 µg of EV total protein was heated 5 min at 95 °C with sample buffer 2X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glycerol 5%, SDS 10%, 2-mercaptoethanol 2.5%, bromophenol 1%), separated by 8, 10, 12 or 15% SDS-PAGE dependent of protein to analyses and then transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane at 25 mV for 45 min. The membrane was blocked using 5% BSA and incubated overnight at 4 °C with appropriated antibody. The primary antibodies used were: rabbit anti-calnexin (1:1000, Sigma-Aldrich), mouse anti-β-actin (1:5000, Abcam), mouse anti-GAPDH (1:15000, Sigma- Aldrich), rabbit anti-CD9 (1:500, Sigma Aldrich), rabbit anti-Alix (1:1000, Proteintech), rabbit anti-flotillin-2 (1:500, Invitrogen), rabbit anti-TNF-α (1:500, Abcam), rabbit anti-TNFR1 (1:1000, Abcam), mouse anti-glutamine synthetase (1:5000, Thermo Fisher), rabbit anti-glutaminase (1:1000, Novus Biological), rabbit anti-MHC I (1:1000, Invitrogen), rabbit anti-MHC II (1:1000, Invitrogen), mouse anti-CD74 (1:1000, Abcam), rabbit anti-L1CAM (1:1000, Bioss), rabbit anti-ADAM17 (1:250, Abcam), rat anti-CD3 (1:500, Abcam), rabbit anti-CD4 (1:1000, Novus Biological), rabbit anti-CD8 (1:2000, Thermo Fisher), rabbit anti-CD14 (1:1000, Abcam), rabbit anti-CD13 (1:500, Bioss), rabbit anti-CD19 (1:1000, Abcam), mouse anti-CD86 (1:200, Abcam), rabbit anti-CD16 (1:100, Abcam). Anti-rabbit, anti-mouse or anti-rat conjugated with alkaline phosphatase were used as secondary antibodies and incubated at room temperature for one hour. Alkaline phosphatase reacts with revelation reagent creating a purple precipitated proportional of protein content. For Alix quantification anti-rabbit conjugated with horseradish peroxidase was used as secondary antibody and SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) was used to revelation. The bands intensities quantified using the Alpha Imager 2200 version 3.1.2 (AlphaEaseFC 2200 for Windows; Cambridge, United Kingdom) and expressed as percentage of controls mean.

## **10. Study of TGF-β content in extracellular vesicles by ELISA**

The TGF-β content in EV was measured by a DuoSet ELISA Kit (R&D Systems) using 20 µg of total EV protein following the manufacturer's instructions. Values were expressed as the percentage of the mean concentration of the controls.

## **11. Isolation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from frozen PBMC**

CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from frozen healthy volunteers PBMC using EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (StemCell Technologies; Vancouver, Canada) following the manufacturer's instructions. The cell purity of isolated cells was checked by flow cytometry for CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> cells following the protocol as in section 5 of materials and methods. The purity of isolation was around 98%.

## **12. Study of the effect of adding extracellular vesicles to CD4<sup>+</sup> T lymphocyte cultures**

CD4<sup>+</sup> T cells (10<sup>6</sup> cells/mL) were cultured in 48-well culture plates (500,000 cells/well) for 5 days in X-VIVO™ 20 Serum-Free (Lonza; Basel, Switzerland) containing 1% penicillin/streptomycin at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 and soluble anti-CD28 and treated with 10 µg of isolated EV from the different types of subjects (control, without MHE or with MHE) or PBS (Biowest). After 24 hours, 100 µl of the supernatant were collected; the remaining medium and cells were collected after 5 days of culture and stored at 80 °C below zero. Medium were used to cytokines determination and cells to analysis of transcription factors of CD4<sup>+</sup> subsets.

### **12.1. Cytokine level measurement in the culture medium**

The cytokine concentrations released in the culture medium were measured by DuoSet ELISA Kit (R&D Systems) as in section 6 of materials and methods. The concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-21, IL-22, IL-17, and TGF- $\beta$  were measured at 24 hours and 5 days; IL-1 $\beta$  and CCL20 only at 5 days. Cytokine concentrations were referred to the non-EV condition.

### **12.2. Transcription factor expression measurement**

The RNA of the cell culture pellet was extracted using the TRIzol RNA Isolation Reagent (Sigma Aldrich). The RNA of cell culture pellet was extracted using TRIzol RNA Isolation Reagent (Sigma Aldrich). Cells were homogenized with 300 µL of TRIzol RNA Isolation Reagent, mixture with chloroform and centrifuged 15 minutes at 13,000 g at 4 °C. Aqueous phase containing RNA was transferred to a new tube and mixture with isopropyl alcohol to precipitate RNA, then centrifuged 15 minutes at 13,000 g at 4 °C and was washed with cold 75% ethanol. Finally, RNA was resuspended in RNase-free water. Concentration and quality of RNA was checked using NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). The cDNA was synthesized from RNA using a High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems; Foster

## Summary

City, California, United States) and qPCR was performed using Taqman™ assays (Applied Biosystems) labeled with FAM and TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Taqman™ gene expression assays (Applied Biosystems) used (reference, characteristic subset): TBX21 (Hs00203436\_m1, Th1), GATA3 (Hs00231122\_m1, Th2), FOXP3 (Hs01085834\_m1, Tregs), RORC (Hs01076122\_m1, Th17), AHR (Hs00907314\_m1, Th22), and BCL6 (Hs00153368\_m1, Thf). The  $\Delta\Delta C_t$  method was used to determine the target expression referred to the non-EV condition using HPRT1 (Hs02800695\_m1) as a normalizer.

### **13. Study of gene expression and protein content in CD4<sup>+</sup> T cells**

#### **13.1. Protein content analysis in CD4<sup>+</sup> T cells**

To lyse CD4<sup>+</sup> T cells and obtain free proteins, RIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo Fisher Scientific) containing a protease and phosphatase inhibitor (Pierce™ Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets; Thermo Fisher Scientific) were used. BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to determine protein concentration. Protein content was quantified by western blot as in section 9 of materials and methods. The primary antibodies used were rabbit anti-TTP (1:1000, Abcam), mouse anti-A20 (1:1000, Abcam), rabbit anti-TNF- $\alpha$  (1:500, Abcam), goat anti-IL-1 $\beta$  (1:500, Novus Biological), rabbit anti-glutaminase (1:1000, Novus Biological). Anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat conjugated with alkaline phosphatase were used as secondary antibodies.

#### **13.2. Gene expression analysis in CD4<sup>+</sup> T cells**

RNA extraction and cDNA synthesis were performed as in section 12.2 of materials and methods. Taqman™ gene expression assays (Applied Biosystems) used (reference): TLR2 (Hs01872448\_s1), TLR4 (Hs00152939\_m1), CD86 (Hs01567026\_m1), CCR2 (Hs00704702\_s1), IL-1 $\beta$  (Hs01555410\_m1), TNF- $\alpha$  (Hs00174128\_m1), IL-17 (Hs00174383\_m1) and IL-6 (Hs00985639\_m1). The  $\Delta\Delta C_t$  method used to determine the target expression referred to the control group using HPRT1 (Hs02800695\_m1) as a normalizer.

### **14. Statistical analysis**

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software; San Diego, California, USA) and SPSS Statistics v22 (SPSS, Inc; Chicago, Illinois, USA). A descriptive analysis was conducted to characterize the sample. The distribution of quantitative

variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests for normality, and they were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

For comparisons between three independent groups of data, a one-way ANOVA followed by Tukey's test was used to compare means among the study groups. When comparing two independent groups of data, a Student's t-test was performed. In the case of experiments involving the *in vitro* effect of EV on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, a reference group that was not incubated with EV was used. For this case, a paired Student's t-test was used to compare the effect of each type of vesicle with respect to the reference condition. Subsequently, a one-way ANOVA for related samples followed by Tukey's test was used to compare means in pairs within the conditions cultivated with EV. Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### **1. Diagnosis of minimal hepatic encephalopathy and determination of ammonium levels**

MHE was diagnosed using the PHES battery. In our cohort of cirrhotic patients, 29.8% of the patients were diagnosed with MHE. Blood ammonia levels are elevated in cirrhotic patients compared to controls, with higher levels observed in patients with MHE.

### **2. Study of cognitive and motor impairment**

#### **2.1. Processing speed and selective attention: SDMT (oral version)**

Patients with MHE obtained significantly lower scores in the total number of items and total number of correct pairings compared to the other groups, indicating impaired in processing speed and selective attention. Patients without MHE also showed impairments in processing speed and selective attention, but milder than patients with MHE.

#### **2.2. Cognitive flexibility and inhibition of automated response: Stroop test**

The incongruent task of the Stroop test allows us to evaluate cognitive flexibility and inhibition of automated response. Patients with MHE show deficits in this cognitive function, as they obtain lower scores in the incongruent task compared to the other groups.

### **2.3. Selective-sustained attention and concentration: d2 test**

The total effectiveness index (TOT) and the concentration index (CON) of d2 test help us evaluate selective-sustained attention and concentration, respectively. Patients with MHE obtain significantly lower scores on both indices compared to the other groups, indicating an impairment in selective-sustained attention and concentration. Patients without MHE also show impairments in selective-sustained attention and concentration, but milder than patients with MHE.

### **2.4. Working memory: digit span test and letter-number sequencing test**

The different tasks of the digit span test and the letter-number sequencing test allowed us to evaluate working memory. Patients with MHE showed poorer working memory compared to the other group, as they complete a lower number of series in these tests. Patients without MHE also show a mild impairment in working memory as measured by the the number-letter test but milder than patients with MHE.

### **2.5. Motor coordination: bimanual and the visuo-motor coordination test**

For the evaluation of motor coordination, the bimanual coordination test and the visuo-motor coordination test were used. Patients with MHE show impairment in motor coordination, as they take longer to complete the tests compared to the other groups.

## **3. Study of lymphocyte populations in peripheral blood**

### **3.1. B lymphocytes**

Patients with MHE show a higher percentage of B lymphocytes and naïve B lymphocytes, while the percentage of memory B lymphocytes is reduced. Additionally, there is a decrease in the percentage of unswitched and switched B lymphocytes in cirrhotic patients. The activation of different B lymphocyte populations was evaluated by the percentage of CD69<sup>+</sup> cells within each studied population. No significant differences were found in the activation of B lymphocyte populations. Levels of molecules related to the development and activity of B lymphocytes, such as BAFF, APRIL, BDNF, and IgA, were determined. Levels of APRIL and BDNF decreased in cirrhotic patients. BAFF levels increased only in cirrhotic patients with MHE. IgA levels increased in cirrhotic patients, with significantly higher levels in patients with MHE compared to the other study groups.

### **3.2. T CD4<sup>+</sup> lymphocytes**

Regarding the percentage of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, no differences were found among the study groups. However, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from patients with MHE showed higher levels of activation compared to the other study groups. In terms of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets, it was observed that the percentage of Th22, Th17, and Th9 lymphocytes was increased in patients with MHE. Additionally, the percentage of Th1 lymphocytes was decreased, while the percentage of Th2 lymphocytes was slightly increased in patients with MHE. No changes were observed in the percentage of Th17 and Tregs lymphocytes, as well as in the activation levels of all CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets. Calculating the ratio between two populations allows us to analyze the pro-inflammatory/anti-inflammatory balance within each subject. In patients with MHE, the Th17/Tregs ratio was increased, while the Th1/Th2 ratio was decreased. Levels of IL-17, a cytokine characteristic of Th17 cells, were increased exclusively in patients with MHE.

### **4. Study of gene expression and protein content in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes**

In CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from cirrhotic patients, an increase in glutaminase content and CCR2 receptor expression was observed. In CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from patients with MHE, an increase in TLR4 expression was observed compared to the other groups, while no differences were observed in TLR2 expression.

The expression of mRNA for cytokines of interest in MHE was also analyzed. The mRNA expression levels of IL-6 and IL-17 were increased in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from cirrhotic patients, with IL-17 mRNA expression being significantly higher in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from patients with MHE compared to the other groups. The mRNA expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were similar among the study groups. Serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were elevated in patients with MHE, and the discrepancy with the mRNA expression of these cytokines in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes could be due to mechanisms that regulate the translation of these messengers, such as TTP and A20 proteins. Analysis of the protein content in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with MHE revealed an increase in IL-1 $\beta$  content, while the levels of TTP and A20 were reduced compared to the other groups.

## **5. Study of the protein content in extracellular vesicles isolated from plasma**

### **5.1. Isolation and characterisation of extracellular vesicles**

According to the specifications and operational guide for the purification of EV from IZON, an initial measurement of the EV concentration and protein in each fraction is recommended. Initially, all fractions from F0 to F18 were analyzed by NTA and by BCA protein quantification. The elution fractions F6 to F10 were enriched with vesicles with a diameter of approximately 50–200 nm. Coomassie blue staining in the fractions eluted (F1–F18 fractions) showed that plasma proteins began to be detected from the F11 fraction, and the EV concentration decreased from this fraction. EV samples are positive for EV markers such as flotillin-2, CD9, and alix, and negative for endoplasmic reticulum marker calnexin, indicating absence cellular debris contamination.

Fractions 6–10 obtained from the IZON column were pooled and concentrated for each sample and analyzed by NTA. The particle mode size (particle size/mL) is provided by the NTA. The total particles and total protein of EV were referred to the initial volume of plasma used to isolate EV (5 mL), the same for all samples. The average particle size of the EV was higher in patients than in the controls, and the total protein of EV was increased in patients with MHE compared to the patients without MHE and the controls. The amount of EV was reduced in both patient groups compared to the controls. In summary, the samples from cirrhotic patients showed a reduction in the quantity of EV, but an increase in their average size. Additionally, EV from patients with MHE contained a higher amount of protein compared to the other groups.

### **5.2. Analysis of cellular origin markers**

To assess the cell origin of the EVs we analyzed by Western blot different markers: CD3 (for lymphocytes), CD4 (for T helper lymphocytes), CD8 (for T cytotoxic lymphocytes), CD19 (for B lymphocytes), CD86 (for antigen presenting cells), CD14 (for monocytes), and CD16 (for pro-inflammatory monocytes). We also assessed the expression of two markers related to CNS cells: L1CAM (neurons) and CD13 (microglia). EV from patients with MHE showed increased levels of markers CD4, CD8, and CD19 compared to the controls and with MHE groups, suggesting an increase in EV from T helper, T cytotoxic and B lymphocyte origin. EV from MHE patients showed decreased levels of CD16 and CD86 compared to the controls and without MHE patients. The levels of CD3 and CD14 did not change between groups. EV from



the plasma of MHE patients were enriched in L1CAM compared to the controls and patients without MHE, suggesting an increase in EV from neuronal origin. No changes in the content of the microglia marker CD13 were observed.

### **5.3. Analysis of molecules involved in immune system activation**

The EV from patients with MHE showed an increased content of MHC II and CD74 compared to the controls and to patients without MHE. The levels of MHC I did not change between groups.

### **5.4. Analysis of inflammation markers**

Plasma EV from MHE patients showed a significant increase in inflammatory markers such as TNF- $\alpha$  and ADAM17 compared to the controls and patients without MHE. ADAM17 is a protein that releases membrane-bound TNF- $\alpha$  into its soluble form, thereby enhancing its function<sup>164</sup>. There were no changes in the TNFR1 receptor. There was a significant decrease in the content of anti-inflammatory cytokine TGF- $\beta$  in EV of MHE patients compared to the controls and patients without MHE.

### **5.5. Analysis of enzymes involved in the ammonia metabolism**

We analyzed the content of two enzymes involved in ammonia metabolism: glutaminase and glutamine synthetase. EV from the plasma MHE showed an increase in the glutamine synthetase content compared to the controls and patients without MHE groups. The content of glutaminase was not altered.

## **6. *In vitro* study of the effect of extracellular vesicles on CD4<sup>+</sup> T lymphocyte cultures**

To evaluate if EV isolated from plasma of MHE patients play a role in the induction of inflammation and differentiation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in MHE patients, we performed an *in vitro* experiment in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. We added plasma-isolated EV from control subject and cirrhotic patients with and without MHE to control CD4<sup>+</sup> T lymphocyte cultures.

To evaluate the effects of plasma EV on the profile of the cytokines released by CD4<sup>+</sup> T cultures, we measured the IL-17, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$  levels at 24 hours of culture. Incubation of the CD4<sup>+</sup> control cells with EV from MHE patients induced a significant increase in the IL-17 and IL-21 levels at 24 hours, compared to the condition without the addition of

## *Summary*

EV (non-EV) or with the addition of EV from the controls or NMHE patients. In contrast, the IL-22 levels decreased after the addition of EV from MHE patients compared to the controls and to the non-EV condition. The TNF- $\alpha$  levels were significantly decreased by the addition of EV from the controls or patients. EV from the controls reduced the expression of IL-17 and induced a significant release of TGF- $\beta$  at 24 hours compared to the non-EV condition and with the addition of EV from patients. The levels of cytokines IL-21 and IL-22 were not affected. EV from the NMHE patients did not affect the expression of IL-17, IL-21, IL-22, and TGF- $\beta$ .

After 5 days of culture, the IL-17 levels remained increased and there were also significant increases in the TGF- $\beta$  levels in the presence of EV from MHE compared to the EV from the controls and NMHE patients. In the presence of EV from MHE patients, the IL-1 $\beta$  levels were lower than the non-EV condition and control EV after 5 days of culture. There was a significant decrease in TNF- $\alpha$  and CCL20 after 5 days of culture after the addition of EV from the controls and NMHE patients compared to the non-EV condition. The levels of these cytokines did not change in the presence of EV from MHE patients, being significantly higher than those from the controls and from NMHE.

We assessed whether the addition of EV induced the differentiation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to different cell subtypes. After 5 days of the addition of EV, the expression levels of the transcription factors TBX21, GATA3, RORC, BCL6, AHR, and FOXP3 were analyzed by qPCR as transcription factors selective for Th1, Th2, Th17, Thf, Th22, and Tregs, respectively. Cultures with the control EV led to a reduction in TBX21 and AHR expression in the CD4<sup>+</sup> T cells compared with the non-EV condition, while its expression was not affected by the NMHE or MHE EV. GATA3 and RORC expression were not affected by any kind of EV added. The expression of BCL6, transcription factor of Thf cells, was significantly increased after 5 days of incubation with EV from MHE patients compared to those from the control subjects. In contrast, the expression of this transcription factor was reduced in the presence of EV from the controls and NMHE patients with respect to the condition without EV. In cells treated with EV from MHE patients, the expression of FOXP3 was significantly increased compared to the other conditions. EV from NMHE patients also induced a higher expression of FOXP3 compared with the non-EV condition. The enhanced FOXP3 expression, together with the increased TGF- $\beta$  levels, suggest that MHE EV could lead CD4<sup>+</sup> T cells to differentiate into Treg cells. Although the expression of the transcription factor RORC did not change in the presence of the EV of MHE patients, suggesting that they did not increase the differentiation

of CD4<sup>+</sup> T cells to Th17, the increased levels of IL-17 and CCL20 at 5 days of culture would indicate that EV from MHE patients would induce the activation of Th17 cells in the cultures.

## **DISCUSSION**

### **1. Diagnosis of minimal hepatic encephalopathy and characterization of associated cognitive and motor impairments**

HE is a complex neuropsychiatric syndrome characterized by functional impairment of the CNS as a result of chronic or acute liver failure, presenting a wide range of neurological and psychiatric manifestations, from subclinical manifestations to coma<sup>5</sup>. MHE is the first stage in the spectrum of HE and is considered the major risk factor for its development. MHE is not detected in a general clinical examination as patients do not present clinical symptoms, but it is detected through specific neuropsychological tests.

Currently, the gold standard tool for diagnosing MHE in patients with liver disease is the psychometric test battery PHES. In fact, during the 14th ISHEN Congress (2010), it was agreed that for multicenter studies, two diagnostic methods for EHM should be used, with PHES being one of them<sup>19,22,149</sup>. In this thesis, the PHES battery was used for the diagnosis of cirrhotic patients. From the 131 patients with liver disease, approximately 30% were classified as patients with MHE, similar to the prevalence obtained in other recent studies<sup>165,166</sup>. These findings highlight that MHE is present in a large proportion of patients with chronic liver failure.

In addition to using the PHES test battery for the diagnosis of MHE, other more sensitive psychometric tests were performed in this thesis to more accurately characterize the cognitive and motor impairments associated with MHE. Through these more precise psychometric tests, it was demonstrated that patients with MHE exhibit cognitive impairment characterized by poor processing speed, selective attention, sustained selective attention, concentration, cognitive flexibility, automated response inhibition, and working memory. Patients without MHE also show alterations in these cognitive functions, indicating that these changes are among the earliest to occur as a result of liver disease and that these alterations cannot be detected by PHES, as shown in previous studies<sup>167</sup>. Patients with MHE exhibit poorer motor coordination compared to patients without MHE and controls. These impairments were not observed in patients without EHM, indicating that poorer motor coordination appears in the

## Summary

later stages of cognitive decline associated with liver disease and is only manifested in patients diagnosed with MHE by the PHES.

In summary, the results obtained confirm that patients with MHE exhibit associated cognitive and motor impairments, specifically reduced processing speed, selective attention, sustained selective attention, concentration, cognitive flexibility, working memory, and motor coordination<sup>13–16</sup>. These impairments are subtle and undetectable in daily clinical practice, and they are responsible for the reduction in quality and life span, increased accidents and hospitalizations among patients, making EHM a significant social, economic, and healthcare problem<sup>168–171</sup>.

## **2. Alterations in the immunophenotype of B lymphocytes and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with minimal hepatic encephalopathy**

Previous studies conducted in patients with MHE have shown various changes in the immunophenotype of different leukocyte populations. The most significant changes include an increase in pro-inflammatory monocytes and memory and autoreactive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, as well as increased activation of total CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, and autoreactive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes<sup>112</sup>. Regarding the B lymphocyte population, an increase in plasma IgG levels has been observed in these patients, and it is hypothesized that the increase in IL-22 and CXCL13 plays a key role in the infiltration of B lymphocytes into CNS and the formation of tertiary lymphoid organs, processes that have been identified in autoimmune pathologies such as multiple sclerosis<sup>112,172,173</sup>. This suggests that changes in lymphocyte populations may be inducing or mediating MHE, highlighting the need for further characterization of the immunophenotypic changes in patients with MHE.

BAFF has been found to be elevated in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus<sup>174</sup>. Elevated levels of BAFF can disrupt immune regulation and lead to the loss of tolerance processes, favoring the survival of autoreactive B lymphocytes by evading apoptosis and their release into the periphery<sup>175–178</sup>. High levels of BAFF have been found in the cerebrospinal fluid and brains of patients with multiple sclerosis and other autoimmune pathologies, supporting studies that associate the action of autoreactive B lymphocytes and autoantibodies in autoimmune diseases like multiple sclerosis; together with the chemokine CXCL13, these factors may participate in the recruitment and activation of B lymphocytes<sup>179–181</sup>.

The increase in total B lymphocytes exclusively observed in patients with MHE could be attributed to elevated levels of BAFF, which promote their survival. This same cytokine could mediate the generation of autoreactive B lymphocytes in the periphery, leading to the production of autoantibodies that contribute to immune alterations in these patients. Additionally, elevated levels of BAFF, along with CXCL13, may facilitate the infiltration of these B lymphocytes into the brain, the formation of tertiary lymphoid organs, and the generation of autoantibodies, thereby promoting neuroinflammation. This hypothesis has been previously proposed for patients with MHE and has been demonstrated in multiple sclerosis, but further analysis is necessary to evaluate autoantibody levels in patients with MHE.

Regarding the populations of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, the main changes observed in patients with MHE included increased activation of total CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, higher percentages of Th2, Th22, Th17, and Th9 lymphocytes, and an elevated Th17/Tregs ratio. There was also a reduction in the percentage of Th1 lymphocytes in patients with MHE, resulting in a decreased Th1/Th2 ratio.

The Th17, Th22, and Th9 phenotypes, which were increased in patients with MHE, express the CCR6 receptor on their cell membrane, and its ligand is CCL20. This interaction plays a pro-inflammatory role in autoimmune diseases and is involved in the pathological recruitment of these cells across the BBB in EAE<sup>182-186</sup>.

The increase in Th17, Th22, and Th9 populations would lead to an elevation of their characteristic cytokines in patients with MHE, such as IL-17, IL-22, and IL-9, respectively. The increase in these populations and their cytokines may mediate disruption of the BBB, the infiltration of these lymphocytes, and the induction of neuroinflammation in patients with MHE, as demonstrated in other pathologies<sup>72,79,81,187,188</sup>.

The IL-17 and Th17 cells also play an important role in the generation of autoreactive T and B lymphocytes<sup>62,189</sup>. In patients with MHE, IL-17 may promote the increase and activation of autoreactive T lymphocytes, as previously described by our group<sup>112</sup>. Future analyses will be necessary to evaluate if patients with MHE have a higher proportion of autoreactive B lymphocytes and/or production of autoantibodies, and whether these are influenced by the action of IL-17 and Th17 cells.

IL-9 promotes the differentiation of Th17 cells from naive CD4<sup>+</sup> cells and their infiltration into the CNS via CCL20 produced by astrocytes<sup>186,190,191</sup>. The IL-9 is also implicated in the pathogenesis of EAE, as neutralization of IL-9 attenuates disease severity<sup>55</sup>. Similarly, the

## Summary

increase in the percentage of Th9 cells in patients with MHE would lead to elevated levels of IL-9 in the blood, promoting the pathological effects of Th17 cells.

An increased Th17/Tregs ratio is associated with autoimmune diseases and indicative of an inflammatory state, characterized by an increase in Th17 cells promoting inflammation and a decrease in Tregs with anti-inflammatory function<sup>192</sup>. In other conditions involving peripheral inflammation, neuroinflammation, and cognitive impairment such as Parkinson's disease, an increased Th17/Tregs ratio has also been observed<sup>193</sup>. The elevated Th17/Tregs ratio in patients with MHE indicates a pro-inflammatory state and a lack of anti-inflammatory phenotypes, exacerbating the other observed immunological alterations.

### **3. Study of gene expression and protein content changes in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with minimal hepatic encephalopathy**

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are involved in various pathologies associated with peripheral inflammation and neuroinflammation, such as multiple sclerosis. The results of this thesis, along with previous studies from the group, highlight the significant role of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in the development of MHE. Similar to other conditions, alterations in the gene expression pattern of these cells may contribute to their pathological effects. Therefore, understanding the expression pattern of specific molecules and proteins that regulate these processes in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with MHE would enhance our understanding of the mechanisms underlying peripheral inflammation.

Gene expression analysis revealed an overexpression of mRNA associated with the CCR2 receptor and the cytokines IL-6 and IL-17 in cirrhotic patients, while in MHE, mRNA expression of IL-17 and the TLR4 receptor was significantly higher than in the other groups. The expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA were not altered. To explain the discrepancy between mRNA levels and plasma levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , we analyzed the levels of proteins that negatively regulate the transduction process of these cytokines, such as TTP and A20, and found that they were decreased in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of subjects with MHE.

The chemokine CCL2 is the ligand for the CCR2 receptor, expressed in monocytes and T lymphocytes, and is involved in inflammation and the attraction of these cell types<sup>194</sup>. CCR2 plays an important role in some neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and multiple sclerosis, where it mediates aberrant migration<sup>195,196</sup>. Additionally, in models of liver inflammation, it has been found that microglia are activated and produces CCL2, promoting

the infiltration of monocytes into the CNS<sup>197</sup>. Similarly, the increased expression of CCR2 in cirrhotic patients would promote the infiltration of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes into the CNS, as observed in cirrhotic patients and those with HE<sup>198</sup>. This effect may be intensified in patients with MHE due to alterations in their immune system, which disrupt the integrity of the BBB, particularly through the action of IL-17<sup>70-72,112</sup>.

TLRs are capable of detecting pathogen-associated molecular patterns and initiating a signaling cascade that leads to the production of pro-inflammatory cytokines and other molecules via NF- $\kappa$ B to combat the pathogen. However, alterations in TLR activation can result in excessive inflammation or autoimmune diseases<sup>199-201</sup>. Changes in TLR activation, especially TLR4, have been associated with multiple sclerosis, as these patients and EAE models show increased TLR4 expression<sup>202-204</sup>. Moreover, the administration of TLR4 ligands such as LPS exacerbates EAE in animal models, while blocking these receptors prevents its development<sup>205-207</sup>. TLR4 activation by LPS is also implicated in the differentiation of Th17 cells<sup>208</sup>. Qu *et al.* observed that TLR4 expression was increased during the development of multiple sclerosis and EAE, and deficiencies in TLR4 activation inhibits the generation of Th17 cells and the onset of EAE, demonstrating that TLR4 activation is essential for Th17 cell development<sup>209</sup>. The increased expression of TLR4 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of MHE patients, along with the higher presence of LPS in the blood of cirrhotic patients<sup>210-212</sup>, would lead to greater activation of these receptors, resulting in increased production of pro-inflammatory cytokines and the generation of Th17 phenotypes in patients with MHE.

Regarding the generation of Th17 lymphocytes, studies on immunometabolism have shown that an increase in glutaminolysis, the transformation of glutamine into glutamate by glutaminase, promotes the development of Th17 cells while inhibiting the development of Th1 cells<sup>213</sup>. Therefore, the increased content of glutaminase in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of cirrhotic patients would also favor the generation of Th17 cells and reduce the generation of Th1 cells, as observed in this study.

The mRNA expression of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-17 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with MHE showed expression levels that did not correlate with the protein content of these cytokines in the same cell type, indicating the existence of a post-transcriptional mechanism that affects these cytokines. The expression of these cytokines could be modulated by mechanisms involving the proteins TPP and A20, which negatively regulate the synthesis of pro-inflammatory cytokines by destabilizing their mRNA or controlling the activation of the

## Summary

NF- $\kappa$ B pathway, respectively<sup>84,89–91,98,214</sup>. In CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with MHE, we found a decrease in the content of TTP and A20 compared to healthy subjects or cirrhotic patients without MHE. The change in the content of these regulatory proteins would favor the synthesis of the pro-inflammatory cytokines analyzed in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with MHE, which corresponds to the levels in plasma<sup>112</sup>. The function of TTP also affects the development and functions of Th17 lymphocytes, as animal models deficient in the TTP protein showed increased serum levels of IL-17 and developed chronic skin inflammation with an increase in the Th17 population in the affected areas<sup>215</sup>. The decrease in the content of TTP in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with MHE could also contribute to the generation of Th17 lymphocytes.

In summary, we found changes in the content or expression of certain molecules in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with MHE, including an increase in glutaminase content and the expression of TLR4 and CCR2, as well as a decrease in TTP and A20 content. These alterations would lead to an increased activation and synthesis of pro-inflammatory cytokines in these cells and promote the generation of Th17 lymphocytes from naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, as observed in patients with MHE in this study and previous studies by the group<sup>26,112</sup>. Additionally, these changes could contribute to their infiltration into the CNS, as observed in cirrhotic subjects and subjects with EH<sup>198</sup>.

## 4. Role of extracellular vesicles in the changes associated with minimal hepatic encephalopathy

EV are structures composed of a lipid bilayer, among which exosomes, ranging in size from 40 to 160 nm. They are generated through a process of double invagination of the plasma membrane<sup>114</sup>. Exosomes are produced by most of cells and contain proteins such as cytokines, enzymes, receptors, or ligands, as well as nucleic acids, predominantly miRNA<sup>113,216</sup>.

The composition of nucleic acids and proteins in EV is influenced by the physiology of the cell that generates them. Therefore, alterations in the originating cell can lead to changes in the composition of EV<sup>147</sup>. This confers great potential to EV as biomarkers for the early or non-invasive diagnosis of various pathologies, especially those related to CNS, which is difficult to access<sup>114,118,119,148,217</sup>.

EV have been attributed various functions, both physiological and pathological. Several studies have demonstrated their involvement in immune-related changes, such as immune system activation, participation in innate and adaptive responses, activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T



lymphocytes, modulation of T lymphocyte phenotypes, and activation of signaling pathways in immune cells<sup>125,126,139,218–222</sup>.

EV can exert their function through two basic mechanisms: 1) by releasing their content into the target cell through membrane fusion, or 2) by interacting with receptors on the target cell through ligands present on the EV surface<sup>116,223,224</sup>.

#### **4.1. Characterization of extracellular vesicles isolated from plasma of patients with minimal hepatic encephalopathy**

The results indicated that the EV from cirrhotic patients were larger in size and less abundant compared to the control group, while samples from patients with MHE contained a higher amount of protein.

In plasma, the most of EV are derived from platelets, monocytes, and dendritic cells, with 2/3 of the EV originating from platelets<sup>225</sup>. It is well-documented that cirrhotic patients have a low platelet count compared to healthy individuals, which is further exacerbated by alcohol abuse<sup>226–228</sup>. This decrease in platelet count has also been observed in cirrhotic patients with and without MHE, with no differences between groups<sup>229</sup>. The decrease in platelets in patients with and without MHE, along with a mild decrease in the monocyte marker CD14 in EV, may explain the reduction in the number of EV in cirrhotic patients. Moreover, a reduction in CD14 and CD16 markers in EV from patients with non-alcoholic fatty liver disease has been described, and these data correlate with an increase in the degree of fibrosis in these patients, which could explain the reduction in these markers in cirrhotic patients due to a higher fibrosis state<sup>230</sup>. In other inflammatory conditions such as infection by human immunodeficiency virus, a reduction in total EV and an increase in the average size of particles have also been observed, which correlated with immunological parameters reflecting disease progression<sup>118</sup>.

Regarding the increase in protein in plasma-derived samples from patients with MHE, this could be a consequence of the larger size of the particles, which would increase the amount of internalized proteins. Furthermore, unlike EV from patients without MHE, the increased presence of ligands and surface molecules observed in EV from MHE patients would contribute to the overall increase in protein content in these samples.

#### **4.2. Cellular origin characterization of extracellular vesicles from plasma of patients with minimal hepatic encephalopathy**

The content and number of EV can be altered in pathological conditions. Moreover, EV can modulate the physiology of target cells through their surface ligands or protein content. Since cells modify the content and number of released EV in pathological situations<sup>147</sup>, we analyzed the protein content of different cellular origin markers and molecules that could contribute to the pathophysiology of MHE.

The protein content of various molecules used as markers of immune system cells was analyzed in EV: CD3 (marker of T lymphocytes), CD4 (marker of Th lymphocytes), CD8 (marker of Tc lymphocytes), CD19 (marker of B lymphocytes), CD86 (marker of dendritic cells), CD14 (marker of monocytes), and CD16 (marker of pro-inflammatory monocytes). EV from patients with MHE showed a higher content of markers associated with Th, Tc, and B lymphocytes (CD4, CD8, and CD19, respectively) compared to the other groups. On the other hand, there was a reduction in the content of markers associated with dendritic cells and pro-inflammatory monocytes (CD86 and CD16, respectively). Several studies have demonstrated that increased activation, metabolic stress, inflammatory signals, and oxidative stress can increase the number of EV<sup>231,232</sup>. Therefore, the increased content of Th, Tc, and B lymphocyte markers suggests that these cell types are altered in the pathology. These alterations correspond to the increased activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and the percentage of total B lymphocytes in peripheral blood observed in patients with MHE, as described in this study, as well as an increase in oxidative stress in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, and B lymphocytes in patients with MHE, as observed in previous studies by our group<sup>233,234</sup>. Correlation analysis showed a positive correlation between the percentage of total B lymphocytes and the protein content of CD19 in EV, reinforcing the idea that this cell type is altered in patients with MHE and releases a higher amount of EV into the plasma.

The content of markers associated with CNS cells, such as L1CAM and CD13 (neuronal and microglial markers, respectively), was also analyzed. An increase in EV derived from neurons in the plasma of patients with MHE was observed, which may indicate alterations in these cell types<sup>147</sup>. In relation to this increase, Lachenal *et al.*<sup>235</sup> demonstrated that EV release by neurons is regulated by glutamatergic activity, specifically the activation of AMPA and NMDA receptors. Animal models of hyperammonemia have shown alterations in glutamatergic activity and AMPA and NMDA receptors<sup>236,237</sup>, which could be related to the increase in L1CAM content in EV isolated from plasma of patients with MHE. Analysis of neuron-derived

EV isolated from plasma has been proposed as a useful tool for the diagnosis of CNS pathologies since they can be obtained through a minimally invasive method, and their content reflects the physiological state of the neurons that generate them<sup>118,119,147,217</sup>. Future studies could focus on analyzing the content of EV derived from neurons to assess whether they could serve as biomarkers for alterations in neurotransmission and cognitive impairment associated with MHE.

### **4.3. Characterization of protein content changes in extracellular vesicles isolated from plasma of patients with minimal hepatic encephalopathy and their effect on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes**

The action of extracellular vesicles EV on target cells can occur through 1) proteins that act intracellularly by fusing with the membrane of the target cell and/or 2) surface ligands of EV that interact with receptors on the target cell<sup>116,223,224</sup>. Therefore, changes in the protein content of EV could lead to alterations in the physiology of the target cell. EV from patients with MHE showed a higher content of TNF- $\alpha$ , ADAM17, MHC II, CD74, and glutamine synthetase, as well as a lower content of TGF- $\beta$ .

To evaluate how changes in the composition of EV may modulate the function of the immune system in MHE, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from control subjects were cultured with EV isolated from plasma of control subjects, patients without MHE, and patients with MHE. Then, the pattern of released cytokines and the differentiation into effector phenotypes of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were analyzed. The addition of EV from patients with MHE induced the synthesis and release of pro-inflammatory cytokines IL-17 and IL-21, as well as an increase in the anti-inflammatory cytokine TGF- $\beta$  by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in culture. An increase in the expression of the transcription factor FOXP3, related to Treg lymphocytes, was also detected. On the other hand, the addition of EV from control subjects and subjects without MHE resulted in a decrease in the synthesis and release of TNF- $\alpha$  and CCL20 by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, as well as a decrease in the expression of the transcription factor BCL6, characteristic of Th1 lymphocytes. This indicates that cells cultured with EV from patients with MHE released a higher amount of TNF- $\alpha$  and CCL20 and exhibited higher expression of BCL6.

EV from patients with MHE exhibited an increase in the content of TNF- $\alpha$  and ADAM17. ADAM17 is a metalloproteinase capable of releasing membrane-bound TNF- $\alpha$  into its soluble form, which is more bioactive<sup>164,238</sup>. The increased levels of TNF- $\alpha$  and ADAM17, along with the decreased content of the anti-inflammatory molecule TGF- $\beta$ , suggest that EV from patients

## Summary

with MHE create a pro-inflammatory environment. Several studies have shown that TNF- $\alpha$  contained in EV can activate transcription pathways of pro-inflammatory cytokines such as NF $\kappa$ B and Akt<sup>138,239,240</sup>, as well as sustain the proliferation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and induce the release of other cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-17, and IL-21<sup>138</sup>. Similarly, TNF- $\alpha$  and molecules that enhance its function present in EV from patients with MHE would activate receptors and signaling pathways in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, increasing the production of pro-inflammatory cytokines in the CD4<sup>+</sup> T lymphocyte cultures.

EV from patients with MHE also exhibited an increase in the content of MHC II and CD74, molecules involved in antigen presentation to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and their activation. MHC II is expressed in both B lymphocytes and dendritic cells, as well as in the EV they generate. Since the B lymphocyte-associated marker CD19 was increased and the dendritic cell-associated marker CD86 was decreased in EV from patients with MHE, B lymphocytes would be the main source of MHC II in these patients. MHC II associated with EV can stimulate cytokine production in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes with a low activation threshold, meaning that these cells require little interaction with MHC II to achieve full activation<sup>125,241</sup>. CD74 is a chaperone protein expressed on the surface of cells that co-express MHC II, such as B lymphocytes, dendritic cells, macrophages, etc. CD74 is involved in the trafficking of the MHC II-antigen complex from the endoplasmic reticulum to the cell surface membrane, favoring its presence on the surface of EV<sup>242-245</sup>. Additionally, CD74 also acts as a receptor for macrophage migration inhibitory factor (MIF), a cytokine expressed by T lymphocytes<sup>246</sup>. When MIF binds to its receptor, it activates transduction pathways via NF- $\kappa$ B and stimulates the secretion of cytokines and inflammatory factors<sup>247-250</sup>. After the fusion of EV with the target cell, the CD74 on the EV surface can be maintained on the surface of the target cell, acting as a receptor and making the target cell more sensitive to the MIF ligand, leading to increased release of pro-inflammatory cytokines in these cells.

The increased content of MHC II and CD74 in EV from patients with MHE would contribute to the activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, their differentiation into effector phenotypes, and the increased release of pro-inflammatory cytokines observed in *in vitro* cell cultures.

EV from patients with MHE induce an increase in the expression of the transcription factor FOXP3, characteristic of Treg lymphocytes, and consequently, an increase in the release of TGF- $\beta$  into the medium. On the other hand, EV from control subjects induce a reduction in the expression of the transcription factors TBX21, BCL6, and AHR, which are characteristic of

Th1, Thf, and Th22 lymphocytes, respectively. This effect may be mediated by the TGF- $\beta$  contained in EV, which is more concentrated in EV from control subjects and patients without MHE than in EV from patients with MHE. Álvarez *et al.*<sup>139</sup> demonstrated that EV derived from mesenchymal cells could inhibit the differentiation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes into effector phenotypes through the TGF- $\beta$  contained within them. In these experiments, stimulation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes led to effector phenotypes, whereas when they were co-cultured with EV from mesenchymal cells, this effect was inhibited. Pre-treatment of these EV with TGF- $\beta$  blockers prior to their addition to the cultures reversed the effect of these vesicles on the differentiation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, confirming the role of TGF- $\beta$  in inhibiting effector phenotypes in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. The higher content of TGF- $\beta$  in EV from control subjects mediates the reduction in the generation of Th1, Thf, and Th22 effector phenotypes, as well as the reduction in Thf in cells cultured with EV from patients without MHE. The lower content of TGF- $\beta$  in EV from patients with MHE reduces the inhibitory capacity on effector phenotypes generation in CD4<sup>+</sup> T lymphocyte cultures, allowing these cells to differentiate into effector phenotypes influenced by other components present in EV from patients with MHE.

In summary, we observed changes in the cellular origin and protein content of EV from patients with MHE compared to EV isolated from control subjects or patients without MHE. These changes may be responsible for the effects observed in *in vitro* cultures of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. The main changes observed in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes cultured with EV from patients with MHE include an increase in the cytokines IL-17, IL-21, TNF- $\alpha$ , and CCL20, as well as the transcription factor BCL6 associated with Thf, compared to cell cultures with the addition of EV from control subjects or patients without MHE. These changes are consistent with those observed in patients with MHE *in vivo*, suggesting that EV may play an important role in modulating and inducing changes in the immune system associated with MHE.

## CONCLUSIONS

1. The cognitive and executive functions of patients with MHE are impaired compared to patients without MHE and control subjects.
  2. Patients with MHE are characterized by an increase in total B lymphocytes, which could be due to elevated levels of BAFF in plasma, and a decrease in the ability to generate effector phenotypes of B lymphocytes.
  3. Total CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from patients with MHE are more activated. Moreover, they exhibit a higher proportion of Th2, Th22, Th17, and Th9 phenotypes, which promote peripheral inflammation and lymphocytic infiltration in the brain, contributing to the induction of neurological alterations in patients with MHE.
  4. The upregulation of TLR4 and CCR2 expression in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with MHE would promote a stronger inflammatory response in these lymphocytes and their infiltration into the brain of patients with MHE.
  5. The CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from patients with MHE have lower levels of TTP and A20, proteins that negatively regulate the expression of pro-inflammatory cytokines. This decrease in TTP and A20 content contributes to the increase in IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-17 levels in the plasma of patients with MHE.
  6. Patients with MHE have a higher proportion of EV derived from CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and B lymphocytes, and neurons, indicating an alteration in these cell types.
  7. The increase in MHC II and CD74 content in EV from patients with MHE promotes the activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in these patients.
  8. EV from patients with MHE have lower levels of TGF- $\beta$  and higher levels of TNF- $\alpha$  and ADAM17, promoting a pro-inflammatory environment.
  9. EV from patients with MHE are able to modulate the function of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in culture by:
    - Increasing the release of IL-17 and IL-21.
    - Inducing a relative increase in TNF- $\alpha$  and CCL20.
    - Promoting the activation of Th17 lymphocytes.
    - Favoring the differentiation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes into Thf and Treg phenotypes.
- These effects are similar to those observed in peripheral blood of patients with MHE, suggesting that EV play a role in modulating the immune system of these patients.







## **II. INTRODUCCIÓN**



## 1. Cirrosis hepática

El hígado está implicado en gran variedad de procesos fisiológicos, entre los que se incluyen el metabolismo de macronutrientes, la regulación del volumen sanguíneo, la homeostasis de lípidos, el apoyo al sistema inmunitario y la degradación de componentes tóxicos, tanto de origen externo como interno al cuerpo<sup>1</sup>.

La cirrosis hepática es el estadio final del daño hepático producido por distintos mecanismos de inflamación y fibrogénesis, factores críticos que conducen a la disfunción hepática e hipertensión portal<sup>4</sup>.

Histopatológicamente, la cirrosis se caracteriza por la presencia de nódulos de regeneración rodeados de septos fibróticos, que provoca una extensión del parénquima y un colapso de las estructuras del hígado; esto conlleva una distorsión de la arquitectura vascular hepática. Estas alteraciones resultan en una mayor resistencia al flujo sanguíneo y una peor función del hígado<sup>2,3</sup>.

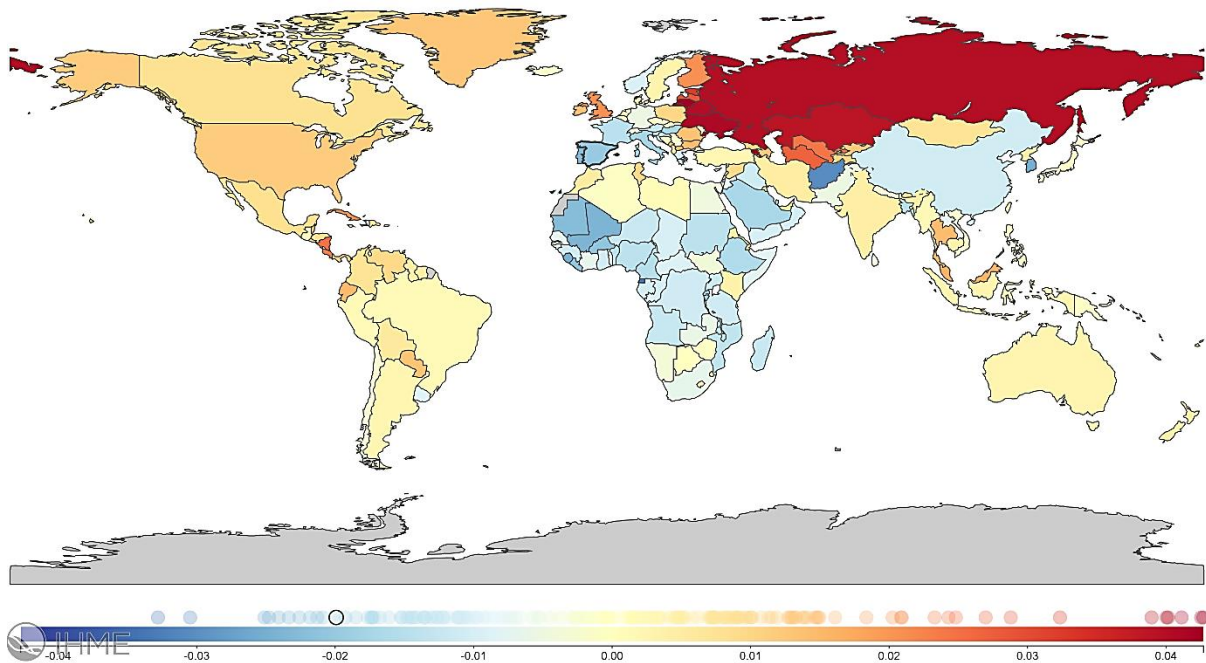
### 1.1. Epidemiología y etiología

En 2017, la cirrosis hepática fue la causa de mortalidad de más de 1,32 millones de personas, 440.000 mujeres y 883.000 hombres aproximadamente, representando el 2,4 % de muertes en la población mundial. Esta cifra se ha incrementado con respecto a datos registrados en 1990, que indican que las muertes que tuvieron como causa principal la cirrosis representó el 1,9 % de las muertes mundiales<sup>251</sup> (Figura 1).

En España, y según los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística, en el año 2020 se registraron un total de 4.441 muertes por cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado, siendo 1.202 de mujeres y 3.239 de hombres. En el caso de España, estas cifras se han reducido desde 1990, año en el que se registraron 7.892 muertes, 2.367 de mujeres y 5.525 de hombres (<https://www.ine.es>).

La etiología de la cirrosis se puede identificar mediante la historia clínica del paciente y análisis serológicos e histológicos. El consumo de alcohol e infección por el virus de la hepatitis C siguen siendo la causa más común de cirrosis en Occidente, y de la cada vez más prevalente enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, del inglés *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*). En menor medida se encuentran infecciones por el virus de la hepatitis B, hepatitis

autoinmune, hemocromatosis o enfermedad de Wilson. También existen factores de riesgo asociados a la aparición de la cirrosis, como son el consumo de alcohol, género masculino, obesidad, hipertensión e hígado graso<sup>2,4,251</sup>.

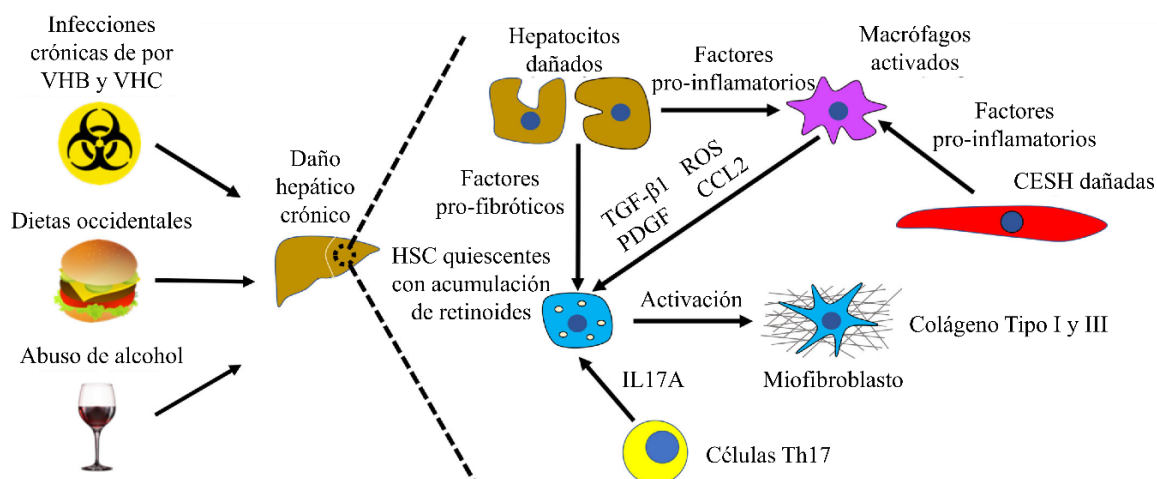


**Figura 1. Cambio porcentual de muertes a nivel mundial por cirrosis hepática y otras enfermedades hepáticas crónicas desde 1990 a 2017 (muertes cada 100.000 habitantes). Remarcado dato de España con un cambio de -2,58 %.** (<https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>).

## 1.2. Fisiopatología

En la cirrosis hepática se produce un proceso de fibrosis progresiva; esta fibrosis hepática conlleva la expansión de la matriz extracelular y la formación de la cicatriz fibrosa, es decir, un reemplazo de tejido sano por tejido fibroso, el cual bloquea el flujo sanguíneo a través del órgano. Este proceso se caracteriza por muerte hepatocelular, inflamación crónica con liberación de citocinas, activación de las células estrelladas del hígado y la alteración del endotelio<sup>252</sup>.

Un daño crónico en el hígado produce daño en los hepatocitos y muerte hepatocelular, que conllevan a la liberación de factores pro-inflamatorios y profibróticos que desembocan en la activación de las células estrelladas, que en consecuencia se diferencian a miofibroblastos y empiezan a expresar genes profibróticos como los de colágeno tipo I y III (Figura 2). La activación de este tipo celular también puede estar mediada por el sistema inmunitario vía citocinas y factores segregados por neutrófilos, macrófagos residentes en el hígado, monocitos y linfocitos T *helper* (Th) 17<sup>253,254</sup>.



**Figura 2. Fisiopatología de la fibrosis hepática** (modificado de Berumen et al., *WIREs Mechanisms of Disease*, 13, 1-17, 2020<sup>254</sup>). Abreviaturas: VHB: Virus de la hepatitis B, VHC: Virus de la hepatitis C, HSC: Células estrelladas hepáticas, CESH: Células endoteliales sinusoidales hepáticas.

### 1.3. Características clínicas

#### 1.3.1. Clasificación

Existen dos escalas utilizadas en la clínica diaria para clasificar la gravedad y evaluar el pronóstico de la enfermedad hepática, la escala Child-Pugh y la escala MELD (*Model for End Stage Liver Disease*):

- Escala Child-Pugh: se utiliza para evaluar el pronóstico de la enfermedad y la supervivencia del paciente. Se calcula mediante la concentración de bilirrubina total y albúmina sérica, el cociente internacional normalizado (INR, del inglés *International Normalized Ratio*) y la presencia y grado de ascitis y encefalopatía hepática (EH)<sup>255</sup>. Se establecen rangos de cada parámetro, donde cada rango tiene una puntuación (Tabla 1). Con la suma de las puntuaciones de cada parámetro obtenemos la puntuación Child-Pugh, a partir de la cual se establecen 3 grados que pronostican la probabilidad de supervivencia (Tabla 2).

**Tabla 1. Escala Child-Pugh. Parámetros y rangos de puntuación.**

Parámetro	Rango y puntuación		
	1 punto	2 puntos	3 puntos
Bilirrubina total (mg/dL)	< 2	2 – 3	> 3
Albúmina (g/dL)	> 3,5	3,5 – 2,8	< 2,8
INR	< 1,7	1,7 – 2,3	> 2,3
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada-grave
Encefalopatía Hepática	Ausente	Grado I – II	Grado III – IV

INR: Cociente internacional normalizado.

**Tabla 2. Escala Child-Pugh. Puntuación y probabilidad de supervivencia.**

Puntos	Grado	Etapas	Supervivencia a 1 año	Supervivencia a los 2 años
5 – 6	A	Cirrosis compensada	100 %	85 %
7 – 9	B		81 %	57 %
10 – 15	C	Cirrosis descompensada	45 %	35 %

- Escala MELD: se utiliza para evaluar el pronóstico y gravedad de la cirrosis hepática; también se utiliza para priorizar a los pacientes en las listas para trasplantes de hígado. Se calcula mediante la concentración de creatinina y bilirrubina y el INR siguiendo la siguiente fórmula<sup>256</sup>:

$$\text{MELD} = 9,57 \cdot \text{Ln}(\text{creatinina}) + 3,78 \cdot \text{Ln}(\text{bilirrubina total}) + 11,2 \cdot \text{Ln}(\text{INR}) + 6,43$$

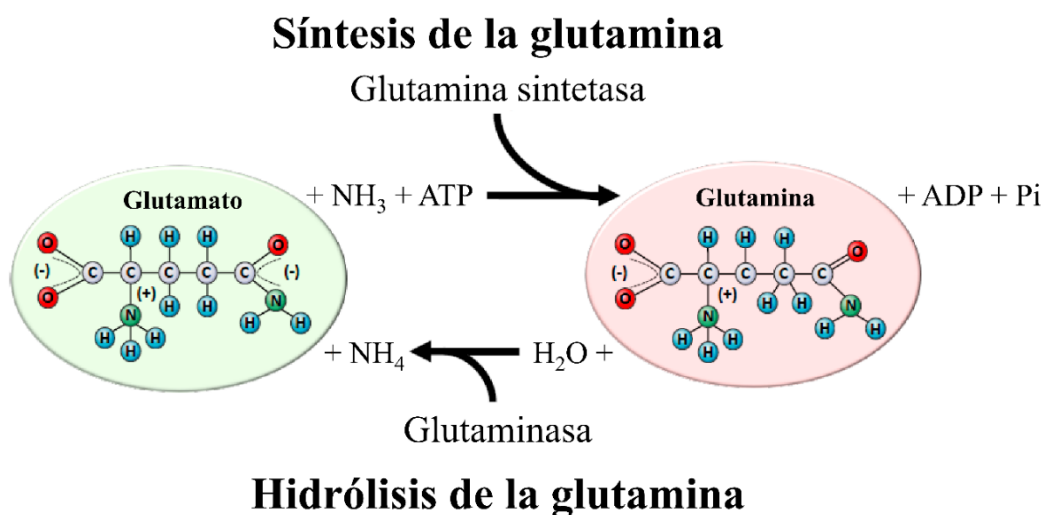
Esta escala también es utilizada para pronosticar la probabilidad de muerte a los 3 meses, que aumenta a medida que aumenta la puntuación obtenida en la escala MELD<sup>257</sup> (Tabla 3).

**Tabla 3. Escala MELD. Puntuación y probabilidad de supervivencia.**

Puntuación MELD	Mortalidad a los 3 meses
≤ 9	1,9 %
10 – 19	6,0 %
20 – 29	19,6 %
30 – 39	52,6 %
≥ 40	71,3 %

### 1.3.2. Hiperamonemia

El amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es un ion producto del metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos y demás compuestos nitrogenados; también es componente importante en la formación de compuestos de importancia biológica como glutamina y glutamato. Existe un equilibrio entre amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) y amonio, pero en condiciones de pH fisiológico el equilibrio se desplaza hacia la producción de amonio. La eliminación del exceso de amonio se lleva a cabo por su incorporación al ciclo de la urea en el hígado y es eliminado con la orina. El amonio también se detoxifica en cerebro y músculo al ser utilizado como metabolito para la síntesis de glutamina mediante la enzima glutamina sintetasa; esta glutamina posteriormente se transporta al hígado y es degradada por la enzima glutaminasa en glutamato y amonio, que se incorporará al ciclo de la urea para ser eliminado (Figura 3)<sup>258</sup>. Si estos procesos de eliminación del amonio no se producen de forma normal debido a una enfermedad hepática, este amonio se acumula en el cuerpo, pudiendo llegar al cerebro y afectar a sus funciones<sup>23-25</sup>.



**Figura 3. Reacciones de catalización de las enzimas glutamina sintetasa y glutaminasa** (modificado de Cruzat *et al. Nutrients*, 10, 1564, 2018<sup>258</sup>).

### 1.3.3. Inflamación

La inflamación es la reacción que se desencadena en un tejido u organismo provocada por agentes patológicos, tanto de origen interno como externo. Esta respuesta se puede dar frente a agentes externos como virus, bacterias, parásitos, hongos, agentes tóxicos, radiación o agentes físicos como frío o calor excesivo, así como a agentes internos como daño en los tejidos. También se da frente a tejidos sanos propios en enfermedades autoinmunes o por hipersensibilidad a agentes externos (alergias), ambas enfermedades relacionadas con un funcionamiento anormal del sistema inmunitario.

En este proceso se produce un aumento del flujo sanguíneo al tejido inflamado, un aumento en la permeabilidad del endotelio y una modificación y acumulación de células del sistema inmunitario; todo ello para hacer llegar y concentrar en la zona afectada los componentes necesarios para hacer frente al daño.

En la cirrosis, un daño prolongado en el hígado causa una inflamación que conlleva liberación de citocinas, activación de macrófagos residentes e infiltración de células del sistema inmunitario. Todo este proceso conlleva a la fibrosis hepática y la alteración de sus funciones (ver apartado 1.2 de Introducción)<sup>252,259</sup>.

### 1.3.4. Translocación bacteriana

La translocación bacteriana consiste en el paso de bacterias propias de la microbiota intestinal desde el intestino a tejidos o espacios extraintestinales como los ganglios linfáticos

mesentéricos, la sangre, el líquido ascítico o el páncreas. La disminución de la motilidad intestinal, alteraciones en la microbiota por sobrecrecimiento bacteriano, alteración en los mecanismos de inmunidad innata y un aumento de la permeabilidad intestinal fomentan la translocación bacteriana, aumentando el paso de la microbiota intestinal a los nódulos linfáticos mesentéricos, lo cual predispone a los pacientes a las infecciones<sup>3,259,260</sup>.

La infección más común en pacientes cirróticos es la peritonitis bacteriana espontánea, es decir, la infección del líquido ascítico, aunque también son comunes infecciones del tracto urinario y neumonías. La gravedad de estas infecciones aumenta con el grado de enfermedad hepática<sup>261</sup>.

Estas infecciones en pacientes cirróticos suelen estar causadas por bacterias Gram-negativas de origen intestinal, sobre todo enterobacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*<sup>259</sup>. En etapas tempranas y moderadas de la cirrosis la translocación bacteriana contribuye a la inflamación sistémica, ya que el lipopolisacárido (LPS) de estas bacterias Gram-negativas actúa como una endotoxina y genera una estimulación crónica de las células del sistema inmunitario, elevando los mediadores pro-inflamatorios<sup>210</sup>.

## 2. Encefalopatía hepática

La EH es un síndrome neuropsiquiátrico complejo caracterizado por una alteración funcional del sistema nervioso central (SNC) subsiguiente a una insuficiencia hepática. La EH presenta un amplio espectro de manifestaciones neurológicas y psiquiátricas no específicas que van desde alteraciones subclínicas hasta el coma. Estas alteraciones afectan negativamente a la calidad y esperanza de vida del paciente y aumentan la prioridad del trasplante de hígado y la tasa de mortalidad<sup>5,6</sup>. Esta condición se creía potencialmente reversible, pero estudios comparativos del antes y después de trasplante de hígado observaron alteraciones neurológicas en pacientes que sufrieron episodios de EH previos al trasplante; una de las explicaciones es que estos episodios de EH causarían daños cerebrales que no se revertirían con el trasplante hepático<sup>262,263</sup>.

Proporcionar un dato preciso sobre la incidencia de la EH es difícil debido al amplio espectro de manifestaciones, desde subclínicas hasta síntomas evidentes, y las múltiples herramientas diagnósticas. Además, muchos estudios no diferencian la incidencia de los diferentes tipos de EH que existen. A pesar de ello, se estima que la incidencia de EH entre 2001 y 2017 fue del 33% y que alrededor del 30% - 40% de pacientes cirróticos desarrollarán EH<sup>5,264</sup>.



## 2.1. Manifestaciones clínicas de la encefalopatía hepática

La EH produce un amplio espectro de manifestaciones neurológicas y psiquiátricas. En su forma más leve solo se presentan alteraciones asociadas a la orientación, atención, memoria de trabajo y velocidad psicomotora, además de presentar resultados anormales en pruebas clínicas como la electroencefalografía (EEG) y otras pruebas cerebrales funcionales<sup>7</sup>. En estadios posteriores se producen cambios en la personalidad como apatía, irritabilidad y desinhibición; también se producen alteraciones de los ciclos del sueño, desorientación espacio-temporal, estados de confusión junto con periodos de agitación y somnolencia, estupor y coma<sup>5,8</sup>.

Los pacientes con EH también presentan síntomas extrapiramidales como hiponimia (falta de expresión facial), rigidez muscular acompañada de bradiquinesia e hipoquinesia, enlentecimiento del habla, temblores y movimientos anormales, excesivos o inapropiados.

Otras manifestaciones que ocurren desde las primeras etapas de la EH hasta etapas más avanzadas es la asterixis, descrita por primera vez en pacientes con insuficiencia hepática y encefalopatía; este fenómeno consiste en una pérdida de la postura y tono muscular que se suele dar en manos y muñecas, pero que también se puede dar en pies, piernas, brazos, lengua y párpados<sup>265</sup>.

## 2.2. Clasificación

La clasificación de la EH se puede hacer acuerdo a diferentes criterios: 1) según su origen, 2) según la recurrencia de los episodios de EH, 3) según la existencia de factores precipitantes y 4) según la severidad de sus manifestaciones.

### 2.2.1. Según su origen

Se diferencian tres tipos de EH<sup>5</sup>:

- Tipo A: producida por una insuficiencia hepática aguda.
- Tipo B: producida por *bypass* portosistémico.
- Tipo C: producida por un daño hepático crónico o cirrosis.

Diferentes tipos de daño hepático, agudo o crónico (cirrosis), conducen a distintas alteraciones cerebrales y neurológicas, por lo que cada tipo de EH se producirá por unos mecanismos diferentes y requerirán diferentes tratamientos<sup>23</sup>.

### 2.2.2. Según la recurrencia de los episodios

Se diferencian tres tipos de EH<sup>5</sup>:

- Episódica: los pacientes experimentan brotes de EH con más de 6 meses de diferencia.
- Recurrente: los pacientes experimentan brotes de EH en menos de 6 meses desde el último brote.
- Persistente: los pacientes experimentan cambios conductuales que no se revierten combinados con episodios manifiestos de EH.

### 2.2.3. Según la existencia de factores precipitantes

Se diferencian dos tipos de EH<sup>5</sup>:

- Espontánea o no precipitada: cuando no existen factores precipitantes de la EH.
- Precipitada: cuando existen factores que desencadenan la aparición de EH. Entre los factores precipitantes dentro de la EH episódica y recurrente encontramos las infecciones, hemorragias gastrointestinales, sobredosis de diuréticos, trastornos electrolíticos y estreñimiento.

Además de estos factores precipitantes, en pacientes cirróticos existen una serie de factores de riesgo para el desarrollo de EH, entre los que se incluye presencia de encefalopatía hepática mínima (EHM) (ver apartado 3 de Introducción), episodios de EH en la historia clínica, sarcopenia (pérdida de masa y fuerza muscular), hiponatremia (concentración baja de sodio en sangre), epilepsia, diabetes mellitus tipo 2, altos niveles de creatinina y bilirrubina total, bajos niveles de albúmina y el uso de inhibidores de la bomba de protones,  $\beta$ -bloqueantes y estatinas<sup>266</sup>.

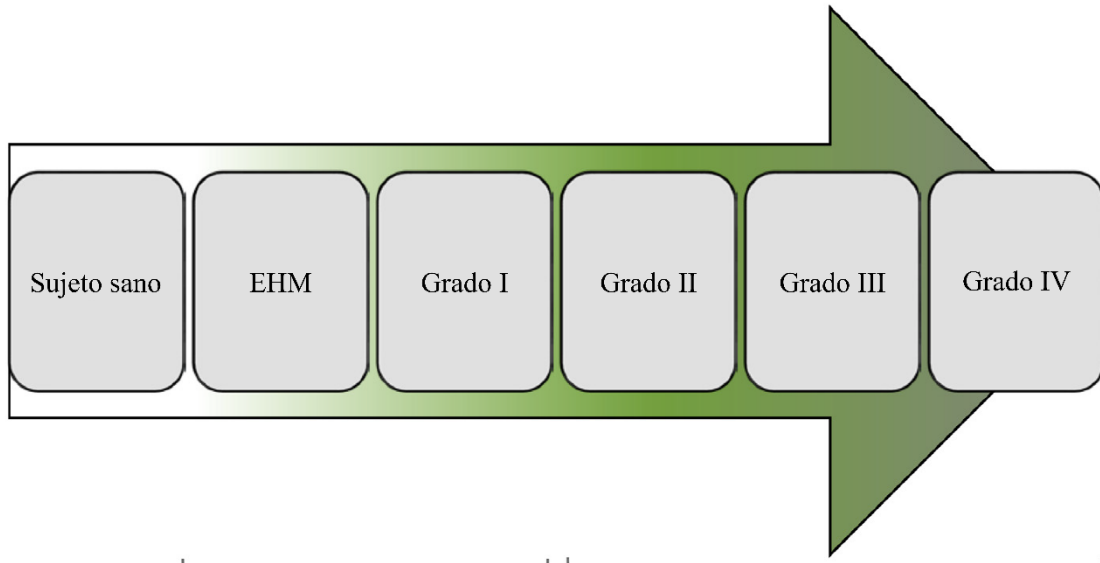
### 2.2.4. Según la severidad de sus manifestaciones

Existen dos clasificaciones en base a la severidad<sup>5,266</sup>:

- Criterios de West Haven: este criterio clasifica la EH en 6 grados (Figura 4A):
  - Sujeto sano: no se presenta ningún signo clínico ni subclínico de la EH.
  - EHM: es la primera etapa en el espectro de la EH. Esta no se detecta en un examen clínico general ya que no presentan síntomas clínicos, sino que se detecta mediante test neuropsicológicos específicos que ponen de manifiesto alteraciones en funciones ejecutivas y psicomotoras.

- Grado I: los pacientes presentan alteraciones cognitivas y conductuales en exámenes clínicos, episodios de euforia o ansiedad, reducción de la atención y alteraciones del ciclo del sueño.
- Grado II: los pacientes presentan asterixis y enlentecimiento de movimientos voluntarios, episodios de letargia y apatía, desorientación temporal, cambios de personalidad y alteraciones en el comportamiento.
- Grado III: los pacientes presentan alteraciones en la orientación espacio-temporal, somnolencia, estupor, episodios de confusión y comportamientos extraños.
- Grado IV: este grado se establece cuando el paciente entra en estado comatoso.
- *International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN)*: distingue la EH en dos tipos: *covert* y *overt* EH (Figura 4B):
  - Covert EH: se caracteriza por alteraciones en las funciones ejecutivas, síntomas subclínicos que no requieren hospitalización. Corresponde a la EHM y Grado I de los criterios de West Haven.
  - Overt EH: se caracteriza por alteraciones en la orientación temporal y espacial o la aparición de episodios de asterixis que pueden evolucionar hasta el coma del paciente. Estos síntomas son llamativos y resultan en la necesidad de hospitalizar al paciente. Corresponde a los Grados II - IV de los criterios de West Haven.

A)



B)



**Figura 4. Clasificación de la EH en base a la severidad de los síntomas según A) criterios de West Haven y B) grados de la ISHEN (modificado de Elsaid & Rustgi, *Clinics in liver disease*, 24, 157-174, 2020<sup>266</sup>).**

### 2.3. Diagnóstico

Reconocer los factores precipitantes de la EH en pacientes cirróticos refuerza el diagnóstico de la EH durante los exámenes clínicos. El diagnóstico de la EH se basa principalmente en el examen clínico del paciente, ver si presenta las manifestaciones clínicas características y evaluar su severidad utilizando los criterios de West Haven<sup>5</sup>. Otras escalas útiles para valorar la gravedad de la EH son las escalas *Hepatic Encephalopathy Scoring Algorithm*<sup>267</sup> o la *Clinical Hepatic Encephalopathy Staging Scale*<sup>268</sup>, aunque son menos utilizadas. Estas escalas son subjetivas y podría variar el resultado según el evaluador, especialmente en los casos más leves, donde las manifestaciones están menos limitadas. Para los casos graves de EHM, del grado III – IV según criterios de West Haven, la escala de coma de Glasgow permite evaluar al paciente de forma más precisa<sup>269</sup>. Existen otras pruebas o análisis que respaldan el diagnóstico de la EH, como son los niveles altos de amonio en sangre<sup>270</sup> o pruebas de neuroimagen como resonancia magnética o tomografía computerizada<sup>271</sup>. Estas últimas pruebas respaldan el diagnóstico de la EH, si bien no son utilizadas como prueba diagnóstica independiente, ya que también podrían estar alteradas en otras patologías.

### **3. Encefalopatía hepática mínima**

La EHM es la primera etapa de la EH y se considera el mayor factor de riesgo para su desarrollo, pudiendo aumentar hasta en 3,7 veces el riesgo de desarrollar EH clínica si el paciente es diagnosticado con EHM<sup>9-11</sup>. En cuanto a la supervivencia de los pacientes diagnosticados con EHM, un estudio prospectivo determinó que los pacientes cirróticos que presentaban EHM tenían una tasa de supervivencia significativamente menor que los pacientes sin EHM: un 68,6% en pacientes con EHM frente al 82% en pacientes sin EHM<sup>12</sup>. La EHM no presenta síntomas clínicos, por lo cual no se detecta en los exámenes clínicos rutinarios, sino que se diagnostica mediante pruebas neuropsicológicas y neurofisiológicas. La EHM presenta deterioro cognitivo y motor caracterizado por alteraciones en las funciones cognitivas y ejecutivas, entre las que se incluyen atención selectiva y sostenida, percepción visuo-espacial o velocidad motora<sup>13-16</sup>. Este deterioro dificulta las tareas diarias, reduce la calidad de vida y supervivencia de los pacientes y aumenta el número de caídas y hospitalizaciones<sup>17-21</sup>. Los pacientes con EHM también presentan alterada su capacidad de conducción, no adaptándose a las situaciones del tráfico, conduciendo de forma menos segura, cometiendo más infracciones y viéndose involucrados en más accidentes<sup>168-171</sup>. Todas estas alteraciones convierten a la EHM en un problema sanitario, social y económico importante. Debido a que estas alteraciones son sutiles y a que no se les suele dar importancia en la clínica, esta patología se mantiene sin diagnosticar ni tratar. Se diagnostica en pacientes con daño hepático tras excluir EH manifiesta u otros tipos de deterioro cognitivo asociado a otras patologías<sup>7,9</sup>.

#### **3.1. Diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima**

El diagnóstico de la EHM también es un pilar fundamental en la prevención de la EH, ya que puede progresar hacia esta. La clave del diagnóstico de la EHM se basa en descartar signos clínicos de EH y en una evaluación neurológica, cognitiva y motora del paciente mediante pruebas psicométricas y neuropsicológicas. Estas pruebas no son específicas para esta patología, por lo que es importante realizarlas solo en pacientes con enfermedad hepática grave y que no presenten factores que puedan alterar sus resultados, como enfermedades neurológicas, medicación o consumo de alcohol<sup>5</sup>. A pesar de obtener resultados normales en estas pruebas y descartarse la presencia de EHM, se recomienda repetirlas en seis meses<sup>272</sup>. Las pruebas diagnósticas más utilizadas son:

- Psychometric Hepatic Encephalopathy Score (PHES): consiste en una batería de 5 subtest que se realiza en papel, que evalúan funciones cognitivas y motoras. La principal ventaja de esta metodología es que es económica y no se requiere equipamiento especial. Este es el test de referencia utilizado en este estudio para el diagnóstico de la EHM en pacientes cirróticos (ver apartado 4.1 de Materiales y Métodos). En el 14º Congreso de la ISHEN (2010) se llegó al consenso de que para el diagnóstico de la EHM en estudios multicéntricos se deberían utilizar dos test: la batería PHES más uno de los que se describen a continuación<sup>22</sup>.
- Test de frecuencia crítica de parpadeo: en esta prueba se le presenta al paciente una luz que empieza a parpadear con una frecuencia de 60 Hz, parpadeo imperceptible al inicio, y que va disminuyendo con el tiempo hasta que el paciente es capaz de apreciar el parpadeo. La frecuencia a la que el sujeto es capaz de apreciar el parpadeo se le denomina frecuencia crítica de parpadeo; esta frecuencia es menor en pacientes con EHM con respecto a pacientes sin EHM<sup>273,274</sup>. La principal desventaja de esta metodología es que requiere instrumental específico para su realización.
- Test de tiempo de reacción continuo: en esta prueba el sujeto tiene que presionar un comando en respuesta a un estímulo auditivo y se mide el tiempo de reacción. A partir de los resultados se calcula un índice que mide la estabilidad de los tiempos de reacción. Requiere equipamiento específico pero la ventaja es que no está influenciado por la edad, género o aprendizaje de la prueba<sup>275</sup>.
- Test de control inhibitorio: es un test computarizado donde el paciente tiene que presionar un botón cuando se le presentan ciertos estímulos (secuencias X-Y o Y-X), mientras que tiene que ignorar otros (X-X o Y-Y). El principal inconveniente es que requiere una gran participación del paciente.
- Test Stroop: evalúa la velocidad de procesamiento y la flexibilidad cognitiva. (ver apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos).
- Test SCAN: es un test computarizado que mide velocidad y precisión en realizar una tarea. Requiere equipamiento específico, pero se ha demostrado tener un valor pronóstico<sup>276</sup>.
- EEG: mediante esta prueba se pueden identificar alteraciones en la actividad cortical que apoyarían el diagnóstico de la EHM mediante otras pruebas, teniendo como principal ventaja que no se necesita de la cooperación del paciente para su desarrollo<sup>277</sup>. Las desventajas de esta metodología es que se necesita instrumental y personal especializado

para realizarlo, el coste económico es muy alto y que sus resultados pueden verse afectados por otras patologías o uso de medicamentos.

### **3.2. Hiperamonemia**

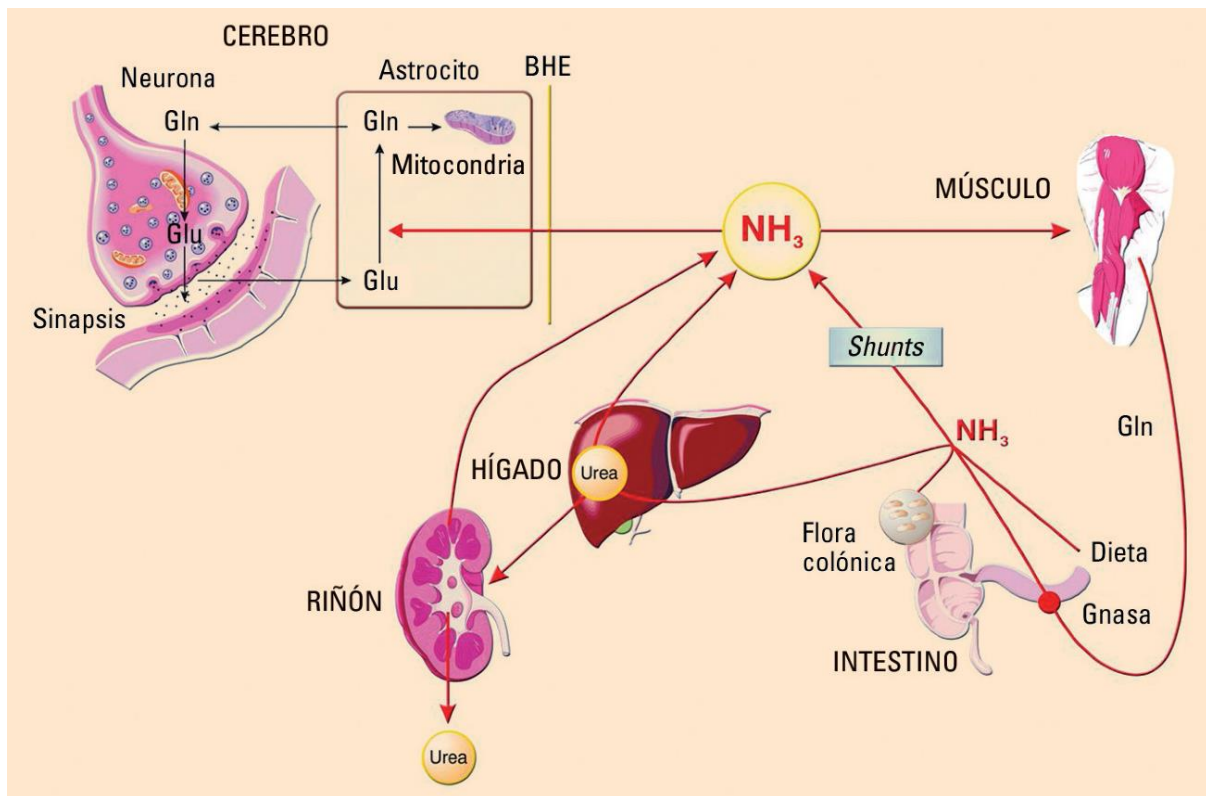
En la cirrosis, la hiperamonemia puede desembocar en disfunción neural, aumento de la presión intracraneal, edema cerebral y EH, por lo que se considera que es un factor de riesgo predominante para el desarrollo de la EH<sup>266</sup>.

En autopsias de pacientes que presentaban hiperamonemia, se encontró edema cerebral e inflamación astrocitaria, así como daño y reducción de la materia blanca, lo que revela una toxicidad cerebral producida por los niveles altos de amonio<sup>278</sup>.

El amonio se produce mayoritariamente en el intestino, procedente de la microbiota intestinal y del metabolismo de compuestos nitrogenados. Este amonio se detoxifica en el hígado mediante el ciclo de la urea, dando como resultado urea que es excretada mediante los riñones y la orina. Cuando existe una falta de función del hígado, como en el caso de la cirrosis, el músculo esquelético cobra mayor importancia en el metabolismo del amonio al incorporarlo al glutamato para sintetizar glutamina mediante la glutamina sintetasa. Este amonio también puede llegar al cerebro, donde su eliminación está mediada por la glutamina sintetasa localizada en astrocitos, incorporándolo al glutamato para producir glutamina, lo cual consume gran cantidad de energía. Los astrocitos liberan la glutamina, que es captada por las neuronas, transformándola en glutamato para ser liberado como neurotransmisor excitatorio. Este glutamato también es captado por los astrocitos en la hendidura sináptica para regular la neurotransmisión (Figura 5).

Los astrocitos son las células encargadas de captar iones y neurotransmisores de la hendidura sináptica, de modo que son esenciales para mantener la excitabilidad de las neuronas y que se produzca una neurotransmisión adecuada. Se ha propuesto que los niveles altos de amonio en los astrocitos provocan una acumulación de glutamina, lo que conlleva la entrada de agua dentro de estas células, que se hinchen y en consecuencia que se produzca un edema citotóxico, provocando muerte de estas células y alteración en sus funciones y la neurotransmisión<sup>23,24</sup>. La acumulación de glutamina también promueve la liberación del glutamato intracelular y acumulación de este en el espacio extracelular, lo que conlleva hiperexcitabilidad mediante la activación de receptores NMDA, acumulación de radicales libres y alteración del metabolismo

del óxido nítrico, reducción de las reservas de ATP por la síntesis de glutamina y de la función mitocondrial; todo ello conlleva un déficit energético y la muerte celular<sup>279</sup>.



**Figura 5. Vías de metabolismo de compuestos nitrogenados en cirrosis hepática** (Córdova & Córdova, *Medicine*, 10, 713-719, 2008<sup>280</sup>). Abreviaturas: Gln: glutamina; Glu: glutamato; Gnsa: glutaminasa; BHE: barrera hematoencefálica.

En el cerebro también actúa la glutamato deshidrogenasa, que produce amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato al degradar el glutarato; este  $\alpha$ -cetoglutarato es degradado por la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, dando como producto succinato, que entraría al ciclo de Krebs para la obtención de energía. La acumulación de amonio inhibe la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, por lo que se crea un mecanismo de regulación en esta vía. Niveles elevados de amonio producirían una excesiva inhibición de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, provocando una menor oxidación de la glucosa y por consiguiente una producción de lactato y falta de suministro energético celular, pudiendo afectar al funcionamiento normal de las funciones cerebrales<sup>279</sup>.

### 3.3. Inflamación

En diversos estudios se postula la relación de la inflamación en la progresión y gravedad de la EHM. Los estudios de Montoliu *et al.*<sup>26</sup> indicaron que los niveles de las citocinas proinflamatorias interleucina (IL)-6 e IL-18 se correlacionan con la gravedad de la EHM, ya que



los pacientes con niveles más altos de estas citocinas obtenían una menor puntuación en la batería PHES. En otros estudios los niveles del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , del inglés *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) también se correlacionaban con la severidad de la EH<sup>27</sup>. Estudios previos del grupo caracterizaron las alteraciones en el sistema inmunitario de pacientes con EHM, concretamente los niveles de citocinas pro y anti-inflamatorias, los porcentajes de poblaciones linfocitarias y de monocitos y los niveles de expresión de factores de transcripción asociados a varias poblaciones de linfocitos<sup>112</sup>. Se identificaron alteraciones a nivel inmunológico asociadas a la aparición de las alteraciones neurológicas en pacientes con EHM que se describirán en el apartado 4.4 de Introducción.

### **3.4. Efecto sinérgico de la hiperamonemia e inflamación en la inducción de la encefalopatía hepática mínima**

Los niveles de amonio son superiores en pacientes cirróticos con alteraciones cognitivas, pero esta concentración no se correlaciona con la severidad de la EH, sino que sería la inflamación sistémica la que influenciaría la severidad de la EH. Estos datos sugieren que la concentración de amonio *per se* no desencadenaría la aparición de EHM, sino que sería la actuación junto a la inflamación sistémica la que induciría la EHM, ya que se ha descrito que pacientes con niveles mayores de inflamación presentan una progresión a EH más acusada y rápida<sup>28</sup>.

Shawcross *et al.* realizaron un estudio en pacientes cirróticos con inflamación debida a infección a los que administraron una solución de aminoácidos para incrementar los niveles de amonio en sangre y realizaron test psicométricos antes y después del tratamiento de la infección, es decir, en dos grupos de: hiperamonemia más inflamación y solo hiperamonemia, respectivamente. El rendimiento de los pacientes antes del tratamiento era peor, poniendo de manifiesto la influencia de la hiperamonemia y la inflamación en la realización de los test psicométricos<sup>281</sup>.

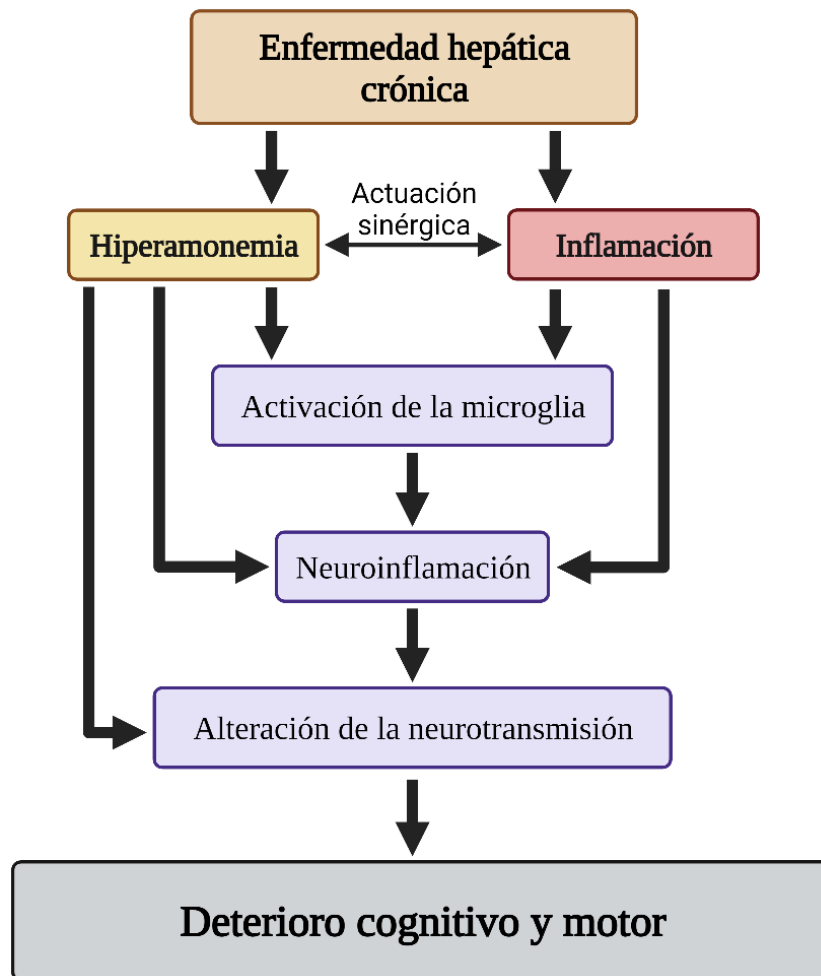
Felipo *et al.* realizaron un estudio con el fin evaluar la contribución de la hiperamonemia e inflamación en la inducción del deterioro cognitivo; para ello, se analizaron los niveles de amonio en sangre, los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL18 y la presencia de deterioro cognitivo mediante la batería PHES en distintas patologías que cursan con hiperamonemia y/o inflamación. Los grupos de pacientes que presentaban deterioro cognitivo medido por la batería PHES también presentaban niveles más elevados de amonio e inflamación en sangre con respecto a los sujetos sanos o pacientes sin deterioro cognitivo. Estos

## *Introducción*

estudios demuestran que hiperamonemia e inflamación actúan de forma sinérgica en la inducción del deterioro cognitivo, ya que si alguno de estos parámetros es normal no se induce el deterioro cognitivo. Además, estos parámetros parecen tener un umbral a partir del cual inducirían el deterioro cognitivo, ya que niveles de amonio en sangre e inflamación mayores que los encontrados en sujetos no serían suficientes para inducir el deterioro cognitivo, sino que estos niveles debían ser mayores<sup>29</sup>.

Estudios realizados en modelos animales que presentan neuroinflamación y deterioro cognitivo y motor también demuestran que la reducción de la inflamación, con medicamentos anti-inflamatorios como el ibuprofeno, es capaz de revertir la neuroinflamación y las alteraciones cognitivas y motoras<sup>282</sup>.

Estos estudios refuerzan la idea de que la hiperamonemia y la inflamación actúan de forma sinérgica en la inducción del deterioro cognitivo y motor en enfermedades hepáticas. La hipótesis que se plantea es que el daño hepático induciría en los pacientes hiperamonemia e inflamación periférica, que podría transmitirse al cerebro provocando la neuroinflamación y alteraciones en la neurotransmisión, que en última instancia produciría el deterioro cognitivo y motor presente en la EHM (Figura 6)<sup>30</sup>.



**Figura 6.** Esquema representativo del efecto sinérgico de la hiperamonemia e inflamación en la inducción del deterioro cognitivo y motor en enfermedades hepáticas crónicas (modificado de Montoliu *et al.* *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 2, 138-144, 2015)<sup>30</sup>.

### 3.5. Neuroinflamación y encefalopatía hepática

Uno de los métodos por el cual se puede evaluar la neuroinflamación en pacientes es mediante la tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *Positron Emission Tomography*) analizando la unión de [<sup>11</sup>C](R)□PK11195 a la proteína translocadora (TSPO, del inglés *Translocator Protein*). Cargnin *et al.* demostraron que en el cerebro de pacientes con EH se producía un incremento en la unión de [<sup>11</sup>C](R)□PK11195 a TSPO y que el mayor incremento se daba en pacientes con un deterioro cognitivo más severo. Estos autores sugieren que el estado alterado de las células gliales sería el causante de deterioro en las funciones cerebrales de los pacientes con EH y que esta neuroinflamación se correlaciona con el grado de deterioro cognitivo<sup>283</sup>.

Estudios *post mortem* en pacientes con EH, revelan que aproximadamente la mitad de los sujetos presentaban microglía activada con cuerpos celulares hipertrofiados y procesos cortos

y engrosados y niveles altos de IL-6. En contraposición, la otra mitad de pacientes presentaban en la sustancia blanca microglía menos activada y distrófica. La conclusión de los autores es que estos datos sugieren que la proliferación de la microglía forma parte de la neuroprotección temprana en EH, que termina por fallar como consecuencia de otros factores como los niveles altos de amonio en cerebro o la inflamación periférica<sup>284</sup>. En otros estudios que apoyan esta idea se encontró un aumento del marcador de activación de microglía IBA-1 (del inglés, *Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1*) en corteza cerebral de pacientes con EH, que no se encontraba en pacientes cirróticos sin EH<sup>285</sup>.

La inflamación sistémica producida por la hiperamonemia también se puede transmitir al cerebro en zonas donde la barrera hematoencefálica (BHE) es más permeable, produciendo neuroinflamación. Esta neuroinflamación se produce por la infiltración de células inmunes que liberan factores pro-inflamatorios que, junto a los factores procedentes de la periferia, actuarán sobre las células residentes en cerebro; los factores pro-inflamatorios en la periferia también pueden actuar sobre las células endoteliales de la BHE estimulando la liberación de otros factores pro-inflamatorios al interior del cerebro y volviéndola más permeable<sup>23</sup>.

La acumulación de amonio en cerebro también puede producir neuroinflamación al actuar directamente sobre células residentes. En cultivos de microglía, un aumento de amonio en el medio de cultivo provoca un incremento en el marcador de activación IBA1, el cual también se encuentra aumentado en el cerebro de pacientes con EH<sup>285</sup>. Estudios realizados en modelos animales de hiperamonemia crónica sin fallo hepático demuestran que estos animales presentan deterioro cognitivo, neuroinflamación y un aumento de la microglía activada, y que el tratamiento con un antiinflamatorio revierte este deterioro, sugiriendo que la neuroinflamación producida por la hiperamonemia juega un papel clave en la inducción de las alteraciones neurológicas en pacientes con EHM<sup>286</sup>.

### **3.6. Alteraciones en la neurotransmisión y encefalopatía hepática**

Las alteraciones en la neurotransmisión, causadas principalmente por el aumento de los niveles de amonio y la neuroinflamación, son las causantes del deterioro cognitivo y motor en pacientes con EH.

Todos estos cambios provocan alteraciones en la función y conectividad de ciertas redes neuronales. Estudios de magnetoencefalografía ponen de manifiesto que en pacientes con EH

existe una alteración en la sincronización y acoplamiento neural en el circuito de ganglios basales-tálamo-corteza, el cual modula la actividad motora<sup>287</sup>.

Estudios de resonancia magnética ponen de manifiesto que los pacientes con EHM presentan alteraciones en la conectividad de la sustancia blanca, con un incremento en la difusión media y una reducción en la anisotropía fraccional, lo cual se traduce en una reducción de la integridad estructural, los cuales correlacionan con subtest de coordinación motora de la batería PHES y el test de Stroop<sup>288</sup>.

En estudios de resonancia magnética funcional (RMf) también se descubrió que los pacientes con EHM presentan alteraciones en la conectividad funcional de redes neuronales, incluyendo el circuito de ganglios basales-tálamo-corteza<sup>289</sup>. García-García *et al.* realizaron estudios de RMf, en los que observaron que los pacientes con EHM presentaban una reducción en el volumen de sustancia gris y un menor grado de conectividad funcional en reposo de varias redes neuronales relacionadas con la atención y funciones ejecutivas. Estas alteraciones se correlacionaban con alteraciones en diferentes test cognitivos; esto se traduce en una reducción progresiva en la conectividad funcional en reposo de la red neuronal por defecto con la progresión del deterioro cognitivo<sup>290</sup>. En estos estudios también se evaluó la relación entre las alteraciones en la memoria y la integridad estructural y conectividad funcional del sistema hipocampal, concluyendo que los pacientes con EHM presentaban menor conectividad funcional entre diferentes áreas del hipocampo, y que estos cambios correlacionaban con el deterioro en la memoria<sup>291</sup>.

Mediante técnicas neurofisiológicas se analizó en pacientes con EHM el potencial de disparidad (MMN, del inglés *MisMatch Negativity*), que es una prueba electroencefalográfica que registra los potenciales evocados auditivos en respuesta un cambio en un estímulo auditivo repetitivo y que refleja la actividad neuronal en procesos de atención. El área de la onda MMN se reduce específicamente en pacientes cirróticos con EHM, pero no en aquellos sin EHM. Además, esta reducción se correlaciona con los déficits de atención en pacientes cirróticos<sup>292</sup>.

#### **4. El sistema inmunitario**

El sistema inmunitario es un conjunto de células, moléculas y tejidos encargados de coordinar una respuesta para proteger al organismo frente agresiones externas, como podrían ser toxinas o patógenos, e internas, como lesiones tisulares o cáncer. La efectividad de este sistema se basa en el reconocimiento específico de estos elementos no deseados y en la regulación del mismo,

ya que una vez hecho frente al patógeno los componentes del sistema inmunitario se restablecen volviendo a una condición normal. La no regulación del sistema inmunitario puede provocar una respuesta desmedida y crónica, desembocando en una situación patológica que puede dañar tejidos y órganos<sup>31,32</sup>.

## **4.1. Respuesta inmunitaria**

La respuesta del sistema inmunitario se basa en dos vías principales: respuesta innata y respuesta adaptativa. Estos dos tipos de respuestas se diferencian por los elementos que la componen, tiempo de reacción y especificidad contra los patógenos, aunque no están totalmente separadas e interactúan entre ellas; por ejemplo, la respuesta innata promueve y modula la adaptativa, mientras que la respuesta adaptativa activa la innata<sup>32,33</sup>.

### **4.1.1. Respuesta innata**

La respuesta innata es el tipo de inmunidad que representa la primera línea de defensa contra los agentes externos. Este tipo de respuesta es rápida e inespecífica, evitando o atacando cualquier elemento nocivo para el organismo. Sus componentes básicos son<sup>33</sup>:

- Barreras anatómicas como piel y mucosas, encargadas de evitar la entrada del patógeno.
- Componentes fisiológicos como la temperatura o pH, que impiden la entrada o proliferación del patógeno.
- Células que fagocitan y eliminan el agente nocivo. Entre las células que actúan en la respuesta innata encontramos monocitos, macrófagos residentes en tejido, granulocitos, linfocitos NK (*natural killer*) y mastocitos, además de fragmentos celulares implicados en la coagulación, conocidos como plaquetas.
- Elementos inflamatorios como proteínas séricas del sistema del complemento, las cuales facilitan la fagocitosis de los patógenos por parte de los neutrófilos al inmovilizarlos, agruparlos o facilitando su reconocimiento.

Este tipo de respuesta es capaz de reconocer patrones conservados en los patógenos sin ser presentados con anterioridad. Estos patrones se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Algunos de estos PAMP son el LPS, peptidoglicanos, ADN bacteriano o ARN de doble cadena. Entre los receptores que detectan los PAMP encontramos los *Toll-like receptors* (TLR), que inducen la transducción de señales que acaban por activar la vía NF-κB y la respuesta inflamatoria en

respuesta a estos PAMP<sup>199</sup>. Estos receptores se expresan en gran parte de las células del sistema inmunitario y existen diez miembros dentro de la familia de los TLR (TLR1 - TLR10), siendo los más estudiados los TLR2 y TLR4. Los TLR2 reconocen el peptidoglicano y el lipoarabinomano presente en bacterias Gram-positivas y micobacterias, respectivamente<sup>199</sup>. Los TLR4 reconocen el LPS de las bacterias Gram-negativas; este reconocimiento requiere la unión del polipéptido MD-2 al dominio extracelular del TLR4<sup>293</sup>. Además de su participación en la inmunidad innata, alteraciones en estos receptores también se han relacionado con diversas enfermedades autoinmunes como psoriasis, diabetes tipo I o lupus eritematoso<sup>200,294</sup>, por lo que se considera que uno de los mecanismos por los que virus y bacterias pueden estar implicadas en el desarrollo de enfermedades autoinmunes es mediante su interacción con los TLR<sup>295</sup>.

#### **4.1.2. Respuesta adaptativa**

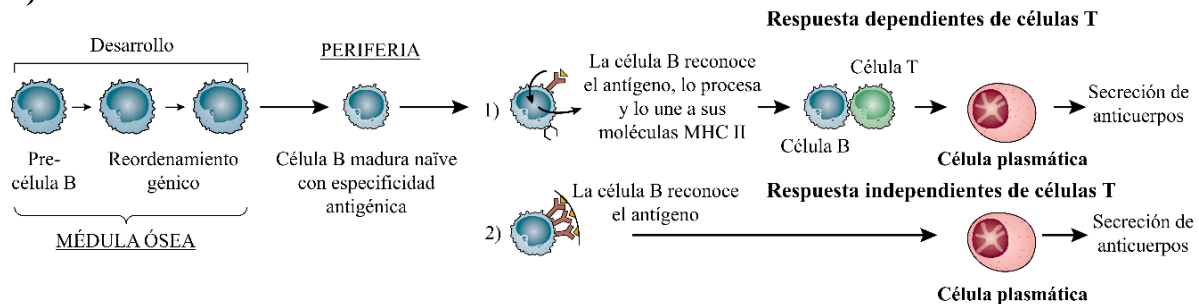
A diferencia de la respuesta innata, la respuesta adaptativa presenta un alto grado de especificidad contra el agente externo. Las células implicadas en esta respuesta son los linfocitos T y B. Dentro de la respuesta adaptativa encontramos dos tipos de respuestas: respuesta humoral, si está mediada por anticuerpos y linfocitos B, o celular si está mediada por linfocitos T. Estos dos tipos de respuesta tampoco actúan de forma independiente, ya que los linfocitos B pueden actuar presentando el antígeno a los linfocitos T, mientras que los linfocitos T pueden ayudar a los linfocitos B a generar anticuerpos.

El primer paso que se produce en la respuesta adaptativa, tanto humoral como celular, es el reconocimiento del antígeno por parte de los receptores de los linfocitos T y B. Los linfocitos B son capaces de reconocer el antígeno libre a través de su receptor, mientras que los linfocitos T necesitan que este sea presentado por las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen-Presenting Cell*). Este reconocimiento provoca la activación, proliferación y diferenciación de estos linfocitos (Figura 7). Este proceso suele producirse en órganos linfoides donde las células maduran, se diferencian o mantienen como células de memoria. Estos órganos linfoides proporcionan un ambiente idóneo para esta maduración, ya que contienen APC y moléculas de adhesión que permiten a los linfocitos moverse y tener más posibilidades de encontrarse con el antígeno. Además, estos órganos linfoides y las células que residen en ellos son capaces de producir citocinas necesarias para el mantenimiento de linfocitos B y T.

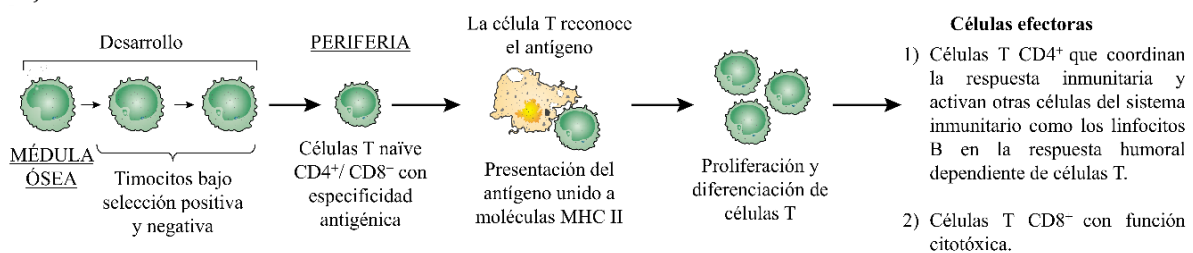
## Introducción

La especificidad de esta respuesta viene determinada por el receptor de los linfocitos T (TCR, del inglés *T Cell Receptor*) y las inmunoglobulinas (Ig), que actúan como receptor antigénico en los linfocitos B. Estos receptores se crean por reordenamiento de genes específicos en los progenitores de los linfocitos T y B, dando lugar a múltiples receptores capaces de reconocer una gran diversidad de antígenos específicos (Figura 7)<sup>31,33</sup>.

### A) Linfocitos B



### B) Linfocitos T



**Figura 7. Esquema de la presentación de antígenos, activación y diferenciación en linfocitos B y T** (modificado de Parkin & Cohen, *The Lancet*, 357, 1777-1789, 2001)<sup>33</sup>. Abreviaturas: MHC II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II.

### 4.1.3. Respuesta humoral y linfocitos B

Los linfocitos B son células especializadas en la producción de Ig o anticuerpos, que median la respuesta humoral. Las células especializadas en la síntesis y liberación de estas Ig son las células plasmáticas (Figura 7A). Las funciones de los anticuerpos son neutralizar toxinas, prevenir la adhesión de organismos a las mucosas, activar el sistema del complemento, opsonizar bacterias para su posterior fagocitosis y reconocer células tumorales o infectadas para su eliminación mediada por anticuerpo. Las Ig están compuestas por cuatro cadenas: dos cadenas pesadas idénticas de 50 kDa y dos cadenas ligeras idénticas de 25 kDa cada una. El extremo amino-terminal de estas cadenas es altamente variable y es el sitio de unión del antígeno. El extremo carboxilo-terminal es constante en los diferentes tipos de Ig, siendo la cadena pesada la que determina el tipo de Ig<sup>31</sup>. Los diferentes tipos de Ig son<sup>296</sup>:



- IgA: predominantemente en mucosas como intestino, tracto respiratorio y tracto urogenital, secreciones como saliva y lágrimas, y en sangre constituye alrededor del 15 % de Ig. Su función principal es la de inhibir la unión de moléculas o patógenos a células y mucosas. La IgA que actúa en mucosas es la forma dimérica, que es transportada desde la sangre al lumen intestinal, respiratorio y urogenital a través de las células de estos epitelios.
- IgD: actúa como receptor de antígenos en las primeras fases de maduración de los linfocitos B. Representa el 0,2 % de Ig en sangre.
- IgE: involucradas en alergias, uniendo alérgenos e induciendo la liberación de histamina en mastocitos y basófilos. Puede actuar en la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Representa el 0,004 % de Ig en sangre.
- IgG: es la principal Ig presente en sangre y tejidos en altas concentraciones. Sus funciones son las de activar el sistema del complemento, la opsonización y actuar en la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Representa el 75 % de Ig en sangre.
- IgM: en su forma monomérica actúa como receptor de antígenos en las primeras fases de maduración de los linfocitos B. Se libera en forma de pentámero y su función es la de mediar la inmunidad contra patógenos al activar el sistema del complemento en las fases tempranas de la respuesta humoral, antes de que se generen suficientes IgG. Representa el 10 % de Ig en sangre.

En las primeras etapas de maduración de los linfocitos B estos expresan en su membrana IgM e IgD, que actúan como receptor antigénico, considerándose linfocitos B *naïve*, es decir, que no han interactuado con un antígeno. Las células B también expresan co-receptores esenciales para la activación como CD19, CD81 y CD21. En la activación y respuesta de los linfocitos B existen dos tipos: la respuesta independiente de células T y la respuesta dependiente de células T.

En la **respuesta dependiente de células T** el antígeno es reconocido por el receptor de linfocitos B, IgM monomérica e IgD de superficie, y es internalizado, procesado y se envía junto a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex class II*) a la superficie de las células B, donde puede presentar el antígeno a células T (Figura 7A.1). El papel de las células T en este proceso es producir factores que inducirán la división, maduración y síntesis y liberación de anticuerpo en los linfocitos B.

## Introducción

En este proceso algunas de estas células se mantienen como células de memoria, lo cual no ocurre en la activación independiente de células T.

En la **respuesta independiente de células T** el antígeno puede activar al linfocito B, induciendo directamente la síntesis y liberación de IgM, sin necesidad de la cooperación de los linfocitos T (Figura 7A.2). Esta respuesta está limitada a la IgM, es poco específica y de corta duración. Los antígenos que se reconocen en este tipo de respuesta son antígenos poliméricos con estructura repetida como el LPS bacteriano. En este tipo de respuesta no se forma centro germinal, no se produce cambio de isotipo ni se generan células B de memoria.

La diferenciación de los linfocitos B se produce en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas, desde linfocitos B inmaduros hasta linfocitos B maduros. Los linfocitos B maduros salen de la médula ósea y viajan hasta órganos linfoides, donde terminan de madurar hasta linfocitos B naïve. En los linfocitos B naïve, tras interactuar con el antígeno en la respuesta dependiente de células T, se produce el cambio de isotipo, generando linfocitos B *switched*. Este cambio de isotipo supone un reordenamiento del ADN mediante varias enzimas que desemboca en cambios estructurales en las cadenas pesadas de las Ig, permitiendo generar toda la variedad Ig para el antígeno que fue reconocido por el linfocito B naïve. El tipo de Ig que se produce viene determinado por las citocinas liberadas por las células T durante la activación: la IL-10 induce el cambio de isotipo a IgG1 e IgG2, el IFN- $\gamma$  a IgG2, la IL-4 e IL-13 a IgE, mientras que el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , del inglés *Transforming Growth Factor  $\beta$* ) induce el cambio de isotipo a la producción de IgA<sup>31</sup>. En el proceso de cambio de isotipo es esencial la interacción de las moléculas co-estimuladoras CD40 en células B y el ligando de CD40 en células T, ya que pacientes con mutaciones en el gen que codifica para CD40 y su ligando desarrollan síndrome de hiper-IgM tipo 1 ligado a X y síndrome de hiper-IgM tipo 2 autosómico recesivo, los cuales se caracterizan por un aumento de los niveles de IgM e inmunodeficiencia<sup>297</sup>.

### 4.1.4. Respuesta celular y linfocitos T

El encargado de reconocer antígenos presentados por moléculas del MHC II en los linfocitos T es el receptor TCR, que normalmente está formado por un heterodímero (cadena  $\alpha$  y cadena  $\beta$ ) con varios dominios y un complejo con la molécula CD3. Dicho complejo transducirá la señal, lo que activará la transcripción de genes implicados en la liberación de citocinas, la división y diferenciación a subtipos celulares efectores para hacer frente al antígeno<sup>34</sup>.

Dentro de las células T encontramos dos subtipos predominantes: los linfocitos Th y los T citotóxicos (Tc), los cuales presentan en su superficie las moléculas CD4 y CD8 respectivamente.

Los **linfocitos T CD8<sup>+</sup>** son células implicadas en la inmunidad frente a infecciones virales y actividad antitumoral. La acción citotóxica de los Tc se da tras reconocer antígenos presentados por el MHC I en la célula diana (Figura 7B.2). Esta acción citotóxica se produce mediante la inserción por parte de los linfocitos Tc de perforinas en la membrana de la célula diana, que crea poros por donde pasan las granzimas liberadas por los linfocitos Tc. Este proceso activa caspasas en la célula diana que inducen la fragmentación del ADN y la muerte por apoptosis. El mismo proceso es utilizado por los linfocitos NK en su actividad citotóxica<sup>31,33</sup>.

Los **linfocitos T CD4<sup>+</sup>** son las células encargadas de orquestar la respuesta inmunitaria y activar a otras células del sistema inmunitario como los linfocitos B (Figura 7B.1). Las células T, antes de ser activadas mediante el reconocimiento de antígenos, se consideran células T CD4<sup>+</sup> naïve. Poco después de ser activadas empiezan a sintetizar IL-2 y se transforman en un fenotipo denominado Th0, a partir del cual se polarizan a diferentes subtipos efectores dependiendo de las citocinas y sus concentraciones presentes en el entorno<sup>35</sup> (Figura 8).

#### **4.1.5. Subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

Los diferentes subtipos efectores de linfocitos T CD4<sup>+</sup> son Th1, Th2, Th17, Th folicular (Thf), Th22, Th9 y T reguladores (Tregs) (Figura 8).

Los linfocitos **Th1** son los responsables de mediar la respuesta tipo 1, que protege frente a patógenos intracelulares como bacterias virus y protozoos, al activar a las células T citotóxicas y a macrófagos M1<sup>36,37</sup>. Son inducidos en presencia de IL-12 e IFN- $\gamma$  y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción TBX21. La IL-12 segregada por las APC es capaz de activar el factor de transcripción STAT4, mientras que el IFN- $\gamma$  producido por células NK y las mismas células T activan STAT1; la activación de estos dos factores de transcripción induce la expresión de TBX21, que a su vez inhibe la expresión de GATA3 y RORC, factores de transcripción característicos de linfocitos Th2 y Th17, respectivamente. Los linfocitos Th1 segregan mayoritariamente IL-2 e IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  activa a macrófagos para hacer frente a patógenos intracelulares e induce la actividad citotóxica en linfocitos NK. La IL-2 induce la proliferación del resto de células T y la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> al disminuir su umbral de activación. Los linfocitos Th1 expresan el receptor de quimiocina

## Introducción

CXCR3, cuya función es la de guiar estas células al sitio de invasión por parte del patógeno y que es utilizado para identificar estas células<sup>298</sup>. Deficiencias en las células Th1 y en la expresión de TBX21 se han asociado a infecciones crónicas y/o recurrentes, además de afectar al desarrollo, maduración y producción de INF- $\gamma$  en el resto de linajes linfoides<sup>299</sup>.

Las células **Th2** son las responsables de mediar la respuesta tipo 2 contra infecciones extracelulares<sup>38</sup>. La respuesta tipo 2 también protege de parásitos como helmintos al activar macrófagos M2 y reclutar eosinófilos, basófilos y mastocitos al lugar de la infección. Son inducidos en presencia de IL2 e IL-4 y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción GATA3. Las interleucinas IL-2 e IL-4 activan los factores de transcripción STAT5 y STAT6 respectivamente, los cuales inducen la expresión de GATA3. GATA3 también inhibe la expresión de TBX21 y RORC<sup>36,37</sup>. Los linfocitos Th2 promueven la respuesta humoral al segregar IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, del inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)<sup>38</sup>. La IL-4 induce el cambio de isotipo en las células B y la producción de IgE. La IL-5 recluta eosinófilos a las zonas de inflamación. La IL-10 estimula la producción de anticuerpos<sup>62</sup>. La IL-13 promueve la producción de mucosa y la hiperplasia de las células que la producen<sup>36</sup>. Los linfocitos Th2 expresan en su superficie el receptor CCR4, el cual se utiliza para identificar estas células<sup>298</sup>.

Los linfocitos **Th17** son los responsables de mediar la respuesta tipo 3 para eliminar patógenos extracelulares como bacterias y hongos al participar en el reclutamiento de neutrófilos e inducir la producción y liberación de péptidos antimicrobianos por parte de células epiteliales como las del intestino, pulmones y piel<sup>39</sup>. También se ha relacionado este tipo celular con enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, donde está aumentado<sup>40,41</sup>. Son inducidos en presencia de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 y concentraciones bajas de TGF- $\beta$ <sup>42,43</sup>. La IL-23 no es necesaria para la inducción y mantenimiento de los Th17, pero sí estimula la aparición de fenotipos más inflamatorios en estas células. Se caracterizan por la expresión del factor de transcripción RORC<sup>44</sup>. Los productos de bacterias y hongos extracelulares activan las APC para liberar IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23, las cuales inducen la diferenciación a Th17 desde linfocitos T CD4<sup>+</sup> naïve; concretamente, la IL-6 e IL-23 son capaces de activar STAT3, que induce la expresión de RORC. Las interleucinas IL-6, IL-21 y TGF- $\beta$  también están implicadas en la diferenciación de las Th17 *in vitro*<sup>37</sup>. Los productos bacterianos o traslocación bacteriana también inducen la diferenciación a linfocitos Th17 mediada por monocitos<sup>300</sup>. Segregan IL-6,

IL-17, IL-21, IL-22 y TNF- $\alpha$ <sup>301,302</sup> que activan a células inmunes y no inmunes para producir óxido nítrico, citocinas y péptidos antimicrobianos para eliminar patógenos extracelulares. Estas células también producen las quimiocinas CXCL8 y G-CSF para reclutar neutrófilos al sitio de inflamación<sup>36</sup>. Alteraciones en este tipo celular se ha relacionado con varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes<sup>303,304</sup>. Mutaciones en RORC o STAT3 producen inmunodeficiencia caracterizada por ausencia de células Th17 que desemboca en mayor susceptibilidad a la infección por bacterias u hongos. Un aumento de la actividad de estas células o de las citocinas que producen se relaciona con enfermedades autoinmunes, por lo que los tratamientos se centran en neutralizar estos componentes. Anticuerpos que neutralizan la IL-23 son efectivos en el tratamiento de la psoriasis, de la misma forma, anticuerpos contra la IL-17 o inhibidores de RORC lo son para el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes<sup>305,306</sup>. Los linfocitos Th17 expresan en su superficie el receptor CCR6, el cual se utiliza para identificar estas células<sup>307</sup>.

Los linfocitos **Thf** ayudan a los linfocitos B en la producción de anticuerpos al promover la formación de centros germinales, favorecer la afinidad de anticuerpos durante la maduración y mediar el cambio de isotipo<sup>36</sup>. Son inducidos en presencia de IL-6 e IL-21 y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción BCL6. Las citocinas IL-6 e IL-21 activan STAT3, que induce la expresión de BCL6. Por el contrario, la IL-2 regula negativamente el desarrollo de los linfocitos Thf al promover la expresión de Blimp-1, un inhibidor de la expresión de BCL6. Estas células se encuentran mayoritariamente en centros germinales de nódulos linfáticos y bazo, cooperando en el proceso de maduración, afinidad y producción de anticuerpos en linfocitos B. En los órganos linfoides secundarios los linfocitos T CD4<sup>+</sup> naïve presentes en la zona T son activados por las células dendríticas; esto conlleva un aumento de CXCR5 en membrana que media el paso de estas células a la zona B. La interacción de los Thf con los linfocitos B fomenta más el aumento de CXCR5 en membrana para que migren al centro germinal y convertirse en células Thf de centro germinal. Estas células Thf de centro germinal promueven la maduración de los linfocitos B y la producción de anticuerpos. La interacción del ligando de CD40 de su membrana con linfocitos B induce la formación de células plasmáticas y células de memoria con gran afinidad y mediante la liberación de IL-21 mantienen y controlan la maduración de los centros germinales. Alteraciones en este tipo celular, ya sea por incremento en su proporción o mediadores liberados, también se han relacionado con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, donde los

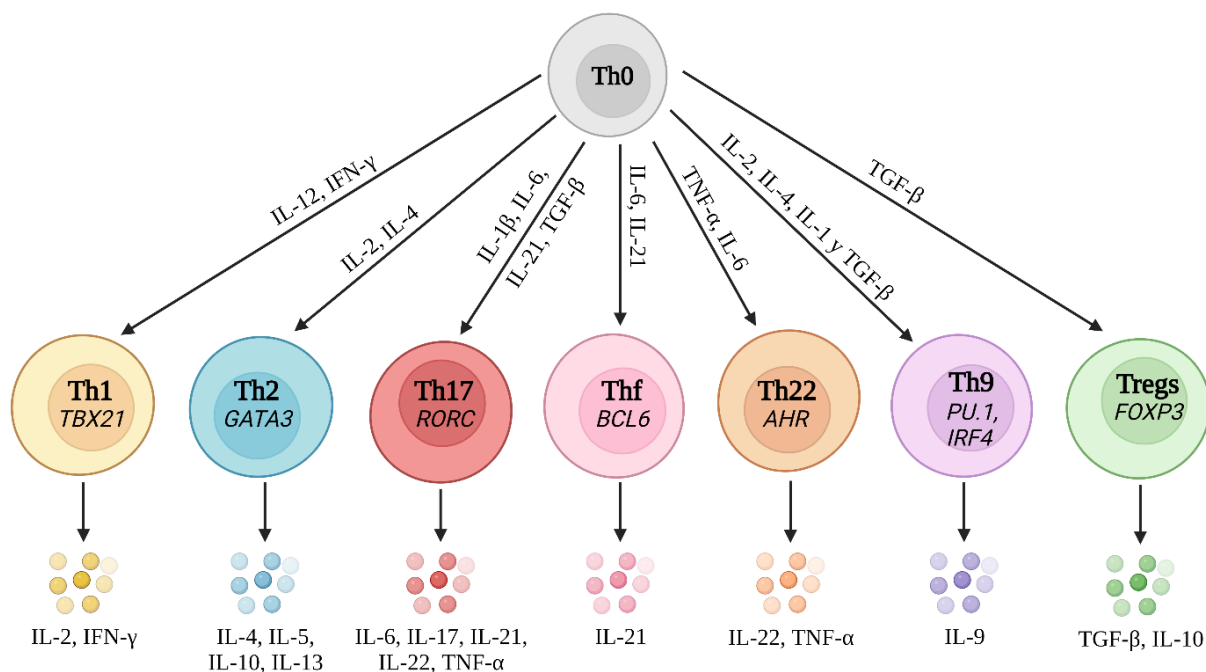
## Introducción

pacientes presentan mayor proporción de estas células y de anticuerpos patológicos en sangre periférica<sup>308</sup>.

Las células **Th22** juegan un papel importante en la protección de mucosas y piel. Son inducidos en presencia de TNF- $\alpha$  e IL-6, potenciando su diferenciación en presencia de IL-1 $\beta$  e inhibiéndose en presencia de TGF- $\beta$  y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción AHR<sup>45,46</sup>. Segregan IL-22 y TNF- $\alpha$ . Tradicionalmente se incluían dentro de las Th17, pero algunos estudios descubrieron que estas células liberaban IL-22 pero no IL-17, además de expresar en su membrana el receptor CCR10, que no expresaban las Th17 y que serviría para identificarlas<sup>45,51,309</sup>. Estas células se encuentran en muy baja proporción en sangre periférica, pero se detectan en mayor medida en dermis y epidermis de pacientes con enfermedades inflamatorias de la piel como psoriasis<sup>49</sup>. A nivel patológico, a la IL-22 se le ha atribuido un papel en las enfermedades inflamatorias de la piel, actuando sinérgicamente con la IL-17<sup>47,48</sup>, amplificando el efecto del TNF- $\alpha$  en el ambiente pro-inflamatorio durante la inmunidad de la piel<sup>49</sup> o activando STAT3<sup>50</sup>. Al igual que las Th17, los linfocitos Th22 también se han relacionado con diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes<sup>46,51</sup>.

Los **Th9** son linfocitos que participan en la inmunidad frente a helmintos. Son inducidos en presencia de IL-2, IL-4, IL-1 y TGF- $\beta$ <sup>310,311</sup> y se caracterizan por la expresión de los factores de transcripción PU.1 e IRF4 y la liberación de IL-9<sup>52-54</sup>, su citocina característica, aunque también se ha descrito que es liberada por otros tipos de linfocitos. La función fisiológica que se le atribuye a la IL-9 es la inmunidad contra helmintos, pero también se ha demostrado que participa en otros procesos patológicos como alergia y asma. Estas funciones de la IL-9 se producen porque es capaz de promover la proliferación y acumulación de mastocitos y otros leucocitos en los tejidos dañados, especialmente tracto respiratorio e intestino. Este subtipo celular expresa en su membrana el receptor CCR6, por lo que son atraídos por el ligando CCL20<sup>186</sup>. La acción de la IL-9 también se ha asociado a enfermedades autoinmunes, como en el modelo animal de encefalomyelitis experimental autoinmune (EAE, del inglés *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), donde la IL-9 media los procesos patológicos que se producen<sup>55,56</sup>. Los Th9 también producen IL-10 que promueve la respuesta humoral<sup>38,186</sup>.

Las células **Tregs** juegan un papel importante en restaurar los parámetros inflamatorios después de que el patógeno o daño es eliminado y en la prevención de enfermedades autoinmunes<sup>36</sup>. Se diferencian dos tipos de linfocitos Tregs: Tregs naturales y Tregs inducidos. Los Tregs naturales se encuentran en el timo y llevan a cabo su función reguladora mediante la liberación de TGF- $\beta$  e IL-10. Los Tregs inducidos se diferencian en la periferia a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naïve tras la interacción con antígenos específicos. Estas células se caracterizan por liberar TGF- $\beta$  e IL-10 y por presentar moléculas CD25 en su superficie, así como por la expresión del factor de transcripción FOXP3<sup>57,58</sup>. Se inducen en presencia de IL-2 y TGF- $\beta$ , que activan los factores de transcripción STAT5 y SMAD2/3 respectivamente, lo que promueve la expresión de FOXP3<sup>59-61</sup>. La función reguladora de estas células se lleva a cabo segregando citocinas reguladoras, como IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$ , eliminando la IL-2 que fomenta la supervivencia y proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> efectoras, liberando perforinas y granzima B para eliminar las APC activas y promoviendo la separación del complejo antígeno-MHC II.



**Figura 8. Subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.** Se muestran las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, junto a las citocinas que inducen su diferenciación, los factores de transcripción característicos y las principales citocinas que liberan.

La descompensación del **cociente Th17/Tregs** es uno de los factores que desencadenan diversas enfermedades autoinmunes como enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y esclerosis múltiple<sup>312</sup>. La diferenciación de estos y del resto de subtipos de linfocitos desde los naïve está regulado, entre otros, por citocinas y microARN (miARN), los cuales activan

factores de transcripción específicos de cada subpoblación<sup>313</sup>. Trabajos previos indican que los miR-155-5p, miR-142-3p, miR-21-5p y miR-146a-5p juegan un papel importante en el cociente Th17/Tregs<sup>314</sup>. Otros estudios demuestran que descompesaciones en el balance de los subtipos de linfocitos juega un papel importante en diversas patologías como en enfermedades autoinmunes<sup>62</sup>.

La **plasticidad celular en linfocitos T CD4<sup>+</sup>** se refiere a la capacidad de estas células de cambiar de un fenotipo a otro, pudiendo generarse a partir de otro subtipo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> además de fenotipos naïve. Este fenómeno se produce en todos los tipos de células T CD4<sup>+</sup>, aunque el tipo con más capacidad de alterar su fenotipo son las células Th17 y Th9<sup>315-318</sup>.

## 4.2. Mediadores de la inflamación

Las citocinas son moléculas capaces de modificar el comportamiento celular mediante la unión a su receptor. Esta unión provoca una señal intracelular que modula la expresión de dicha célula<sup>33</sup>. La función de estas moléculas es variada y depende de la citocina en cuestión y de la célula involucrada. Entre las funciones que se les atribuye se encuentran la activación, división, apoptosis o movilización celular. Existen varias familias de citocinas, como interleucinas, quimiocinas e interferones; moléculas diferenciadas por su función, célula productora y célula diana. Las citocinas también se pueden diferenciar en pro-inflamatorias o anti-inflamatorias según su función. Una de las citocinas pro-inflamatorias más estudiadas es el **TNF- $\alpha$** , producida principalmente por monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células endoteliales y células T. El TNF- $\alpha$  juega un papel importante en la iniciación de los procesos de inflamación, aumenta la proliferación de linfocitos T y amplifica de la liberación de otras citocinas pro-inflamatorias como IL-6 o IL-1<sup>63-65</sup>. Esta citocina también induce la liberación de quimiocinas y moléculas de adhesión que fomentan la atracción de leucocitos a los tejidos inflamados<sup>66</sup>.

Las **interleucinas** son citocinas producidas por leucocitos y cuyas células diana son predominantemente otras células del sistema inmunitario. Algunas de las interleucinas analizadas en este estudio han sido IL-17, IL-21, IL-22 e IL-1 $\beta$ .

La acción de la **IL-17** se ha relacionado con diversas enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide<sup>67</sup>, lupus eritematoso sistémico<sup>68</sup> o esclerosis múltiple<sup>69</sup>, donde sus niveles séricos son mayores. Esta interleucina actúa sobre células endoteliales, macrófagos, monocitos y células T y promueve la liberación de otras citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y



TNF- $\alpha$ . A nivel de neuroinflamación, se ha postulado que las primeras células en infiltrarse en el SNC durante estados patológicos son las Th17, lo cual estaría mediado por la interacción de la IL-17 con el receptor de la IL-17 (IL-17R) en células endoteliales de la BHE, que aumentaría su permeabilidad. Se detectaron los receptores para IL-17 e IL-22 en células endoteliales de lesiones activas en cerebros de pacientes de esclerosis múltiple, mientras que estos receptores no se encontraban en endotelios de la BHE de sujetos sanos, lo que pone de manifiesto un papel de estas dos citocinas en la disrupción de la BHE<sup>70</sup>. La acción de la IL-17 sobre las células endoteliales de la BHE produciría una disrupción en su permeabilidad al reducir las uniones estrechas y al producir especies reactivas del oxígeno, lo que activaría la maquinaria contráctil de los endotelios creando poros por donde se infiltrarían los linfocitos Th17<sup>71,72</sup>. En concordancia con esta premisa, Kebir *et al.* demostraron mediante modelos *in vitro* e *in vivo* que los linfocitos Th17 atraviesan con mayor facilidad la BHE que otros tipos de linfocitos y que la IL-17 e IL-22 aumentarían la permeabilidad de la BHE al disminuir la expresión de las moléculas de uniones estrechas ocludina y ZO-1 en células endoteliales<sup>70</sup>. También se ha encontrado infiltración de estas células en cerebros *post mortem* de pacientes con enfermedad hepática, en concreto, se observó que pacientes con esteatohepatitis leve ya presentaban infiltración de linfocitos Th17 en meninges, y que esta infiltración aumentaba con la progresión de la enfermedad, llegando a presentarse también en pacientes con cirrosis y EH<sup>73</sup>. Estudios en modelos animales de esclerosis múltiple como el modelo de EAE demuestran que la infiltración de las Th17 induce cambios en el perfil de citocinas y quimiocinas presentes en las meninges, lo que mantiene la inflamación y el reclutamiento de otros leucocitos en el cerebro<sup>319</sup>. Esto sugiere que la infiltración temprana de las Th17 en meninges puede ser el principal responsable de inducir y mantener la neuroinflamación en pacientes con esteatosis y cirrosis<sup>73</sup>.

La **IL-21** es producida principalmente por los linfocitos Th foliculares. Es capaz de inducir la expresión de más IL-21 e IL-17 y favorecer la diferenciación a fenotipos Th17 e inhibir la de los Tregs<sup>187,320,321</sup>. Como hemos visto anteriormente, la IL-21 mantiene y controla la maduración de los linfocitos B en los centros germinales.

La **IL-22** tiene un papel sinérgico con las funciones de la IL-17 y el TNF- $\alpha$ . Al igual que la IL-17, también se ha propuesto que la IL-22 contribuiría a la disrupción de la BHE, favoreciendo que las células que expresan esta citocina la atravesasen con mayor facilidad<sup>70</sup> y se ha relacionado con enfermedades autoinmunes como enfermedad de Crohn<sup>74</sup>, psoriasis<sup>75</sup> y artritis reumatoide<sup>76</sup>.

## Introducción

La **IL-1 $\beta$**  es liberada mayoritariamente por monocitos, macrófagos y células dendríticas, estimulada por la acción del TNF- $\alpha$ , aunque también es liberada por linfocitos T CD4<sup>+322</sup>. Esta es una citocina pro-inflamatoria que participa en la respuesta innata y adaptativa, pero que también está implicada en la patogenia de enfermedades inflamatorias como artritis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa<sup>77,78</sup>.

Las **quimiocinas** son un grupo de citocinas que juegan un papel clave en la migración de las células del sistema inmunitario y cuyos receptores están presentes en todos los leucocitos. Estas moléculas son producidas por la mayoría de células en respuesta a citocinas pro-inflamatorias<sup>33</sup>. La **CCL20** es una quimiocina que atrae linfocitos que expresan su receptor en membrana, el CCR6, como serían las Th17, Th22 y Th9. Esta quimiocina es inducida por antígenos microbianos como el LPS o por otras citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ . CCL20 es expresada constitutivamente por epitelios de la piel, pulmones, intestino, BHE y epitelio de los plexos coroideos; en condiciones normales sus niveles son bajos, pero en respuestas a citocinas pro-inflamatorias suben sus niveles<sup>79</sup>. Se ha propuesto que la interacción de CCL20 y CCR6 está implicada en la infiltración de células T al SNC a través de los plexos coroideos. En los estudios de Reboldi *et al.* se sugiere que la inducción de la neuroinflamación en EAE se produce por la infiltración de células Th17 vía la interacción CCR6-CCL20, y que estas células promoverían la infiltración de otras células que no expresan CCR6<sup>80</sup>. Arima *et al.* también demostraron que la interacción CCR6-CCL20 también mediaba la infiltración de linfocitos T autorreactivos durante la EAE<sup>81</sup>. La IL-17 fomenta la producción de CCL20, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  en las células diana, generaría un bucle de retroalimentación positiva que induciría la diferenciación y atracción de más células Th17 al lugar donde las Th17 iniciaron la inflamación. Esto se ha propuesto como un mecanismo implicado en la neuroinflamación consecuencia de lesión medular, ya que se ha demostrado que en estas zonas se induce la producción de CCL20 y esta iniciaría el bucle de retroalimentación positiva<sup>188</sup>.

Los **interferones** se pueden diferenciar en dos tipos, interferones tipo 1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) e interferones tipo 2 o  $\gamma$ . Los interferones de tipo 1 tienen actividad antiviral, mientras que los de tipo 2 tienen funciones pro-inflamatorias activando el sistema inmunitario, estimulando la función linfocitaria o promoviendo la expresión en membrana del MHC II en APC.

Los **factores de crecimiento** son moléculas que controlan el crecimiento celular y reparación de tejidos. Estos factores también pueden tener funciones anti-inflamatorias, como es el caso del **TGF- $\beta$** , controlando la proliferación y diferenciación celular. Esta citocina también

promueve la diferenciación a Th17 y Tregs en función de la concentración a la que se encuentre; un aumento de esta citocina provoca la inhibición de RORC al aumentar la de FOXP3. A bajas concentraciones, y junto a IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-21, favorece la diferenciación a Th17<sup>82</sup>.

#### 4.2.1. Regulación de la expresión de citocinas: papel de TTP y A20

La síntesis de las diferentes citocinas está altamente regulada mediante diferentes mecanismos, entre los cuales se incluyen procesos ubiquitinización, estabilización de los ARN mensajero (ARNm), fosforilación, etc. Dos de estas proteínas son la TTP (*Tristetraprolin* o *zinc finger protein 36 homolog* [ZFP36]) y la A20 (o *tumor necrosis factor- $\alpha$  induced protein 3* [TNFAIP3]), las cuales están implicadas en la regulación de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y de las señales que inducen en la célula diana.

**TTP** regula negativamente la traducción de ARNm que presentan en su secuencia elementos ricos en adenina-uracilo (ARE, del inglés *AU-rich element*) en su región 3', al desestabilizar y promover su degradación<sup>83,84</sup>. Aunque ha sido más estudiada la función de TTP a nivel citosólico, otros estudios también demuestran que esta proteína se encuentra en el núcleo y es capaz de actuar como co-represor transcripcional de diferentes factores de transcripción como NF- $\kappa$ B<sup>84</sup>. Esta proteína es capaz de promover la desestabilización y degradación de diversos ARNm asociados a citocinas, y por tanto de sus niveles proteicos, como TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-6, por lo que una reducción en la función de TTP implica un incremento en la traducción a proteína de estas citocinas<sup>85-90</sup>. De la misma forma, TTP es capaz de regular a otras proteínas como las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 o mediadores de la inflamación como COX-2 o el factor de crecimiento endotelial vascular<sup>90,323,324</sup>. La ausencia de TTP en células T se relaciona con un incremento del marcador de activación CD69 y de las citocinas TNF- $\alpha$  e interferón-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), además de producir una mejor respuesta antiviral al acelerar la respuesta de los linfocitos T y promover la producción de citocinas<sup>324</sup>. En relación a esta regulación de citocinas pro-inflamatorias, se ha observado que ratones deficientes en TTP presentaron inflamación severa<sup>325</sup>. Estudios clínicos correlacionan inversamente los niveles séricos de TTP con los niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-18, proponiendo a esta proteína como un marcador temprano y potencial diana terapéutica en la disfunción renal asociada a pacientes con diabetes<sup>326</sup>. Estudios en linfocitos T demuestran que TTP es capaz de inhibir la síntesis de IL-17, mientras que su silenciamiento la incrementa; esto es posible porque el ARNm de IL-17 contiene varias ARE donde puede actuar TTP<sup>89</sup>.

## Introducción

**A20** es una proteína expresada en el citoplasma que regula diferentes actividades relacionadas con la ubiquitinización, esenciales en la regulación de la activación de la vía NF- $\kappa$ B<sup>91-94</sup>. La excesiva intensidad y duración de la vía NF- $\kappa$ B se relaciona con diversas enfermedades inflamatorias, tanto en humanos como en modelos animales. La expresión de A20 se induce por señales dependientes de la vía NF- $\kappa$ B, y esta a su vez restringe la duración e intensidad de la vía NF- $\kappa$ B, creando un bucle de retroalimentación negativa que impide una actividad descontrolada de esta vía<sup>214</sup>. De forma similar a la vía de NF- $\kappa$ B, la síntesis del ARNm y su proteína A20 es estimulada en respuesta a la IL-17, que a su vez inhibe la respuesta a la IL-17 al unirse al dominio intracelular de su receptor; la unión de A20 a IL-17R impide la fosforilación de TRAF6 y por lo tanto la transducción de señal que desemboca en la activación y traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B, generando un bucle de retroalimentación negativa que regula la señal por IL-17<sup>327</sup>. Por otro lado, la inhibición de A20 promovería la activación de la vía IL-17 – TRAF6 – NF- $\kappa$ B<sup>327</sup>. La acción de A20 está mediada por la actividad desubiquitinasa, al unirse a las cadenas de ubiquitina o al impedir la función de otras enzimas con actividad ubiquitin ligasa, lo cual conlleva la modificación de diversas moléculas implicadas en la cascada de señalización de la vía NF- $\kappa$ B<sup>91,95-98</sup>. A20 está regulando la vía NF- $\kappa$ B que se inicia en diferentes receptores de membrana como el receptor 1 de TNF (TNFR1, del inglés *TNF Receptor 1*), de los TLR, el receptor de IL-1 y el receptor de IL-17, por lo que A20 también regula la respuesta de sus ligandos como LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-17<sup>108,327-330</sup>. Ciertos estudios revelan que linfocitos B deficientes en A20 provocan una activación desmedida de la vía NF- $\kappa$ B e hipersensibilidad a estímulos como el LPS, provocando un incremento en la síntesis y liberación de IL-6 con respecto a células con unos niveles de A20 normales<sup>109,331</sup>. De igual forma, macrófagos deficientes en A20 presentan mayor degradación de moléculas que inhiben NF- $\kappa$ B y mayor producción de TNF- $\alpha$  en respuesta a la activación del TLR4<sup>332</sup>. La reducción de A20 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria también incrementa la síntesis de IL-17 en estas células<sup>333</sup>. Alteraciones en A20 se asocian con diferentes enfermedades inflamatorias, ya que polimorfismos en la secuencia del gen *TNFAIP3* que codifica A20 se han relacionado con lupus eritematoso, artritis reumatoide, psoriasis o esclerosis múltiple<sup>99-107</sup>. Además, ratones con la función de A20 reducida desarrollaron inflamación espontánea y autoinmunidad<sup>109,331</sup>. En el caso de esclerosis múltiple, la expresión del gen *TNFAIP3* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de estos pacientes es menor que en sujetos sanos, y menor aún en pacientes con una progresión más agresiva en comparación a otros pacientes con esclerosis múltiple<sup>107</sup>, además, esta reducción también se ha observado en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y monocitos

de pacientes con esclerosis múltiple, siendo esta reducción más acusada en monocitos<sup>334</sup>. En pacientes con enfermedad de Parkinson también se observó una reducción en la expresión del gen *TNFAIP3*<sup>110</sup>.

### 4.3. Activación del sistema inmunitario

La rapidez y especificidad de la respuesta adaptativa viene dada porque tras la primera interacción con el antígeno, los linfocitos T y B proliferan, llevan a cabo su propósito y luego la mayoría mueren por apoptosis; a pesar de ello se mantienen algunas células, llamadas células de memoria. Estas células de memoria sobreviven tras eliminarse el patógeno y cuando vuelvan a reconocer el antígeno se activarán y dividirán rápidamente para hacerle frente<sup>111</sup>.

**MHC I y respuesta innata:** el MHC I está presente en la superficie de todas las células nucleadas. Esta molécula presenta antígenos sintetizados por la propia célula, tanto propios de la célula como antígenos resultado de una infección vírica. En células normales el MHC I presentará antígenos propios, que harán reconocer a la célula como sana. Como consecuencia de una infección vírica u otra condición patológica este complejo presentará antígenos que son reconocidos por el sistema inmunitario como extraños, marcando a la célula para su eliminación por parte de macrófagos, linfocitos NK o linfocitos Tc. Las células T solo reconocen este tipo de antígenos cuando son presentados en moléculas de MHC I<sup>335</sup>, esto previene que estas células se activen al reconocer antígenos libres.

**APC, MHC II y respuesta adaptativa:** las APC son células capaces de endocitar, procesar moléculas antigénicas y exponerlas en su superficie asociadas al MHC II, reconocido por el complejo TCR-CD3. Cuando estas células procesan el antígeno se activan y migran a los tejidos linfoides para desempeñar su función en la presentación del antígeno y la activación de los linfocitos Th. Dentro de las APC encontramos células específicas de tejido, como las células de Langerhans en la epidermis, células de Kupffer en el hígado o la microglía en el cerebro; otras células no específicas de tejido son las células dendríticas, linfocitos B, monocitos y macrófagos<sup>336</sup>. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> solo reconocen antígenos presentados por las moléculas MHC II. La presencia de MHC II en la superficie celular está limitada a las APC, pero bajo condiciones de inflamación, la estimulación de células endoteliales y epiteliales con INF- $\gamma$  estimula la producción de MHC II<sup>31</sup>.

La interacción del complejo TCR-CD3 con las moléculas del MHC solo produce una activación parcial en las células T, para una activación completa se requiere la participación de moléculas

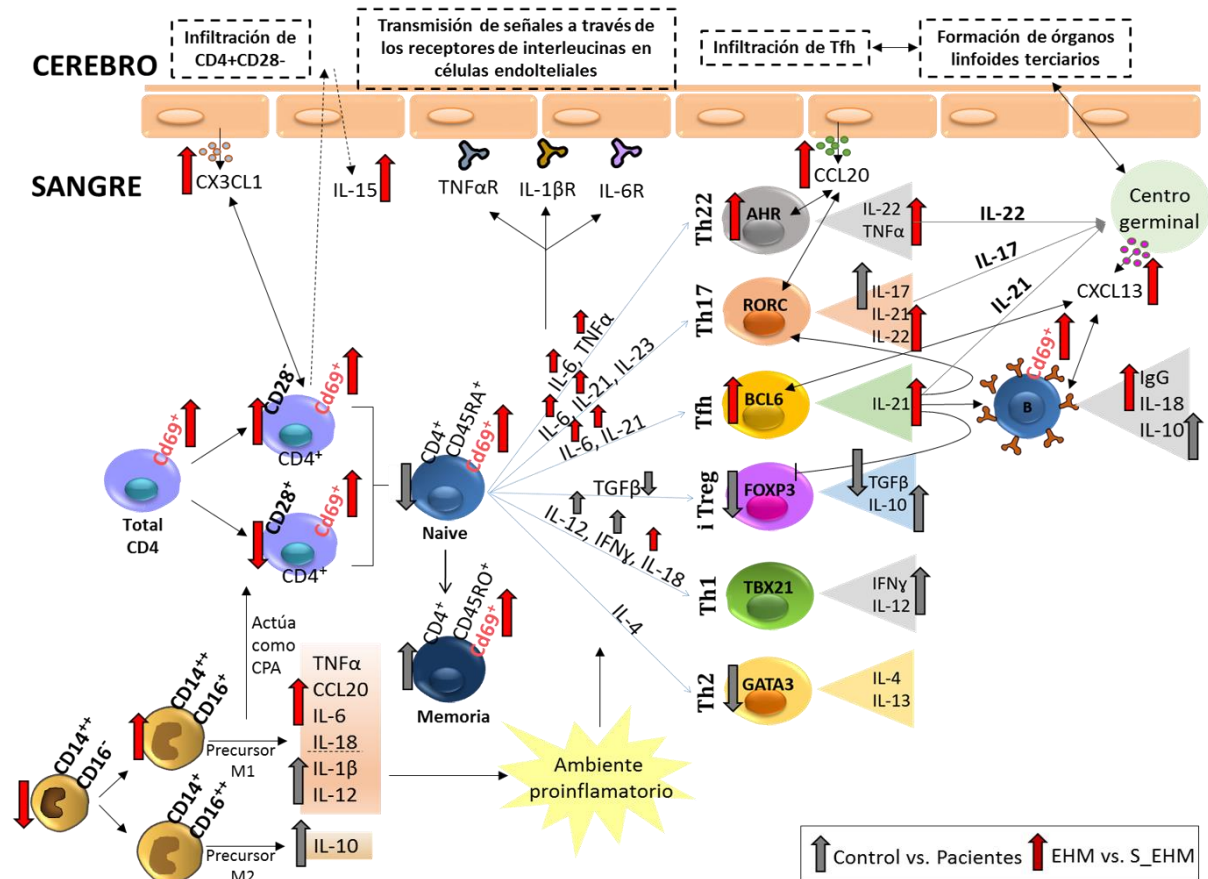
co-estimuladoras. Esto representa un mecanismo de prevención que impide que los linfocitos T se activen de forma inapropiada. Las principales moléculas co-estimuladoras presentes en las APC son CD80, CD86 y CD40, que se unen a los co-receptores presentes en linfocitos T CD28, CTLA-4 y el ligando de CD40 respectivamente. La presencia de mediadores inflamatorios incrementa el contenido en moléculas co-estimuladoras en las APC, por lo que en ambientes pro-inflamatorios se facilita la activación de los linfocitos T mediante las APC<sup>33,337</sup>.

Estos co-receptores están presentes en la mayoría de linfocitos T para su activación total, pero existe un grupo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que no expresan CD28, denominados **linfocitos T CD4<sup>+</sup> autorreactivos**. Este subtipo de linfocito no necesita de moléculas co-estimuladoras para su activación total. Esta población se ha relacionado con procesos inflamatorios en varias enfermedades autoinmunes<sup>338,339</sup>. Estas células también ejercen una función citotóxica parecida a la de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, produciendo perforinas y granzima B, pudiendo dañar células endoteliales y tejidos y liberar grandes cantidades de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ <sup>340,341</sup>. Esta población de linfocitos ha sido ampliamente estudiada en esclerosis múltiple, donde se ha encontrado infiltración de estos en cerebros *post-mortem*. Esta infiltración está mediada por el receptor CX3CR1 que los linfocitos T autorreactivos presentan en su membrana, el cual no se expresa en el resto de linfocitos, atrayéndolos hacia un gradiente positivo de CX3CL1 producido por las células endoteliales de la BHE en estos pacientes. Este proceso y el efecto patológico de esta población se ve amplificado por la IL-15<sup>342-344</sup>. Existen estudios que indican que los linfocitos T autorreactivos también son capaces de atravesar la BHE por mediación del CCL20<sup>81</sup>.

#### **4.4. Alteraciones del sistema inmunitario en pacientes con encefalopatía hepática mínima**

En un estudio previo se caracterizaron las alteraciones en el sistema inmunitario asociadas a la EHM<sup>112</sup>. Los principales cambios detectados en estos estudios fueron un aumento del ambiente pro-inflamatorio, caracterizado por el aumento de los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-21, IL17, IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-22 e IL-15, de las quimiocinas CCL20, CXCL13 y CX3CL1 en plasma de pacientes con EHM. En cuanto a las citocinas anti-inflamatorias se encontró un aumento de la IL-10 y una disminución del TGF- $\beta$ . Los pacientes con EHM también presentaban aumento de los monocitos pro-inflamatorios y linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria y autorreactivos, que contribuirían a la inducción y mantenimiento del

ambiente pro-inflamatorio. También se observó un aumento del marcador de activación temprano CD69 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales, de memoria y autorreactivos y de linfocitos B, lo que indica un nivel de activación mayor de estos tipos celulares. En PBMC se analizaron los factores de transcripción característicos de subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Las PBMC de los pacientes con EHM presentaban un nivel de expresión mayor de los factores de transcripción AHR y BCL6, característicos de los linfocitos Th22 y Thf, respectivamente. Además, cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados de pacientes con EHM producían mayor cantidad de IL-17, IL-21, IL-22 y TNF- $\alpha$  que los de controles o pacientes cirróticos sin EHM; en el caso de la IL-17 e IL-22, este aumento en sus niveles se observaba aún sin una activación completa de las células en cultivo. En este estudio se proponían posibles mecanismos por los cuales los cambios en la inflamación periférica en pacientes con EHM podrían contribuir a la aparición de alteraciones neurológicas: 1) infiltración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> autorreactivos en el cerebro, produciendo neuroinflamación y deterioro neurológico; 2) las interleucinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 procedentes de sangre periférica activarían sus receptores en las células endoteliales de la BHE, estimulando la liberación de factores inflamatorios en el cerebro y produciendo neuroinflamación y alteraciones neurológicas; y 3) la infiltración de los linfocitos Thf y la formación de órganos linfoides terciarios junto con los centros germinales de linfocitos B producirían alteraciones neurológicas<sup>112</sup>. Los cambios en parámetros inmunológicos y los posibles mecanismos propuestos se presentan en la Figura 9.



**Figura 9. Esquema de las alteraciones en el sistema inmunitario asociadas a la EHM en pacientes cirróticos.** Resultados obtenidos en el estudio del inmunofenotipo, niveles de citocinas y quimiocinas y niveles de factores de transcripción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> e hipótesis de los mecanismos que causarían la aparición de las alteraciones cerebrales que conllevan a la EHM (enmarcadas en líneas discontinuas). Las flechas hacia arriba y hacia abajo indican aumento o disminución respectivamente de los parámetros estudiados. Las flechas grises representan los cambios observados en pacientes cirróticos con respecto al grupo control, mientras que las flechas rojas representan los cambios observados en pacientes con EHM con respecto a los pacientes sin EHM. Las flechas discontinuas indican posible infiltración o paso de la BHE. Las flechas de doble sentido indican atracción o relación (Mangas-Losada, *Caracterización de los cambios en el inmunofenotipo asociados a la aparición de la encefalopatía hepática mínima en pacientes cirróticos*, 2017<sup>211</sup>).

En estudios posteriores de nuestro grupo de investigación, se analizaron los efectos del tratamiento con rifaximina sobre el deterioro cognitivo y los parámetros alterados en EHM<sup>345</sup>. En el 59% de los pacientes se revertía el deterioro cognitivo tras el tratamiento con rifaximina (pacientes respondedores), mientras que el 41 % restante seguía presentando EHM tras el tratamiento (pacientes no respondedores). En los pacientes respondedores el tratamiento con rifaximina normalizaba las principales alteraciones asociadas a la EHM: 1) niveles de IL-17, IL-22, IL-21, IL-6, IL-15 e IL-18; 2) niveles de CXCL13, CX3CL1 y CCL20; 3) proporción de monocitos pro-inflamatorios y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> autorreactivos; y 4) niveles de los factores de transcripción BCL6 y AHR. En los pacientes no respondedores la rifaximina solo normalizaba los niveles de IL-6 y CCL20. En cuanto a la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>



totales y autorreactivos medido por el marcador de activación temprana CD69, se observó que los pacientes respondedores tenían un nivel de activación alto en estos tipos celulares antes del tratamiento, mientras que los pacientes no respondedores presentaban niveles de activación bajos antes del tratamiento. El tratamiento con rifaximina en pacientes respondedores normalizaba la activación en linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales y autorreactivos. Estos datos sugieren que los pacientes respondedores y no respondedores antes del tratamiento se encontraban en estados inflamatorios diferentes. Las alteraciones en pacientes no respondedores se encontrarían en un estado más avanzado, mientras que los pacientes respondedores se encontrarían en fases tempranas de la cascada inflamatoria donde podría actuar la rifaximina, normalizando las alteraciones en parámetros inmunológicos asociadas a la EHM y revirtiendo el deterioro cognitivo<sup>345</sup>.

## **5. Vesículas extracelulares**

Las vesículas extracelulares (VE) son estructuras formadas por una bicapa lipídica generadas por la gran mayoría de tipos celulares, tanto en condiciones normales como patológicas, y que contienen proteínas como citocinas, enzimas, proteínas de superficie como receptores o ligandos, lípidos y ácidos nucleicos de diferentes tipos<sup>113</sup>. La composición de estas VE varía en función del estado fisiológico y origen celular. Una de las primeras funciones que se atribuyeron a las VE fue la de actuar como vehículo para eliminar compuestos de desecho o presentes en exceso en la célula, manteniendo así la homeostasis celular.

Dentro de las VE podemos encontrar dos tipos de vesículas: ectosomas y exosomas. Los ectosomas se generan directamente en la membrana plasmática para ser liberados, con un tamaño de entre 50 y 1.000 nm. Los exosomas se forman por una doble invaginación de la membrana plasmática, procesados intracelularmente y liberados; estas estructuras tienen un tamaño entre 40 y 160 nm. Estos últimos son los que han despertado gran interés y son en los que nos centramos en esta tesis. La mayoría de VE circulantes en el organismo son derivadas de plaquetas y células mononucleares, especialmente monocitos y células dendríticas<sup>225</sup>.

Debido al particular mecanismo de formación de los exosomas, que involucra diferentes sistemas celulares, su composición y función al ser liberados vienen determinados por el tipo celular que los genera, así como por su estado fisiológico. Esta característica les convierte en una herramienta potencial en el diagnóstico y la terapia de diversas enfermedades<sup>114</sup>.

## 5.1. Biogénesis y liberación de las vesículas extracelulares

El proceso de generación de los exosomas comienza con la invaginación de la membrana plasmática, arrastrando proteínas ligadas a la membrana como proteínas transmembrana, de superficie o receptores, así como moléculas solubles del espacio extracelular (Figura 10, paso 1a). Este proceso forma un endosoma temprano cuyo contenido es modificado por el retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Figura 10, paso 1b), formando el endosoma tardío (Figura 10, paso 1c).

Una segunda invaginación en el endosoma tardío crea vesículas intraluminales (ILV, del inglés *IntraLuminal Vesicles*), que serán los futuros exosomas liberados, creándose el cuerpo multivesicular (MVB, del inglés *MultiVesicular Body*) (Figura 10, paso 2). Esta segunda invaginación atrapa en el interior de las vesículas componentes del citoplasma y componentes enviados por el aparato de Golgi; como resultado de esa segunda invaginación, en la superficie de los exosomas se sitúan proteínas que originalmente estaban en la superficie celular. Dependiendo del volumen y proceso de formación se generan vesículas con diferente contenido y tamaño. El MVB puede fusionarse con lisosomas (Figura 10, paso 3a) o autofagosomas (Figura 10, paso 3b), degradando así sus componentes y siendo reciclados, o se envían a la membrana plasmática (Figura 10, paso 3c) y se fusionan con ella, liberando los exosomas al espacio extracelular (Figura 10, paso 3d)<sup>116</sup>.

Hay diversas moléculas involucradas en la formación y procesamiento de los exosomas, algunas de las cuales se utilizan como marcadores específicos de este tipo de estructuras. Entre estas moléculas se encuentran las proteínas Rab GTPasa, proteínas ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), tetraspaninas como CD81, CD63 o CD9, TSG101, proteínas SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*), esfingomielinasas, flotillin o Alix y lípidos como fosfolípidos y ceramidas<sup>114,115</sup>.

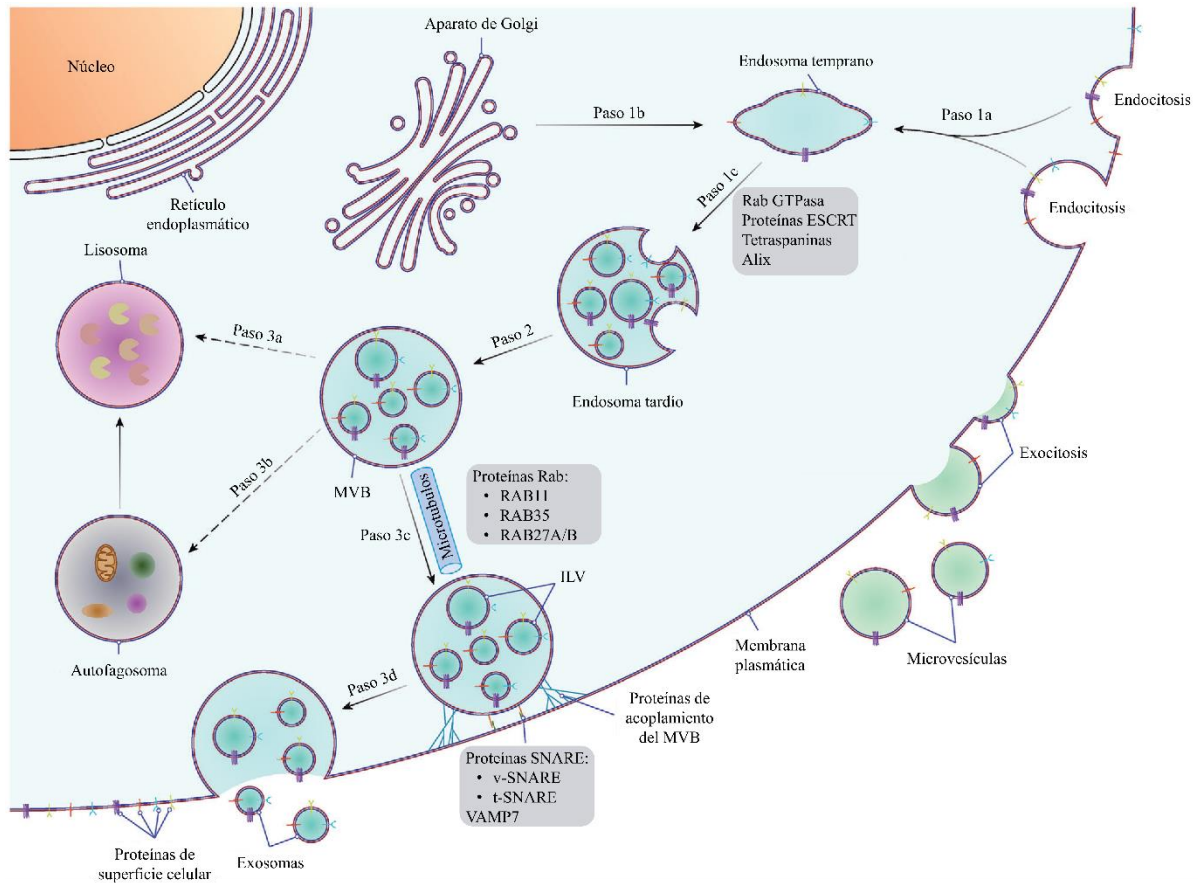
La formación de las ILV ocurre en zonas específicas de la membrana del endosoma, las cuales se denominan *Tetraspanin-Enriched Membrane Domains* (TEM). En estos dominios se acumulan proteínas de la familia de las tetraspaninas, como CD81, CD63 y CD9. Estos TEMs reclutan proteínas para la formación de las vesículas intraluminales<sup>346</sup> y, además, reclutan ligandos para la internalización del exosoma en la célula receptora<sup>347</sup>. Otras proteínas de interés en la maduración de los exosomas son las proteínas de la maquinaria ESCRT, entre las cuales se encuentran varios tipos, ESCRT I – III.

En el **mecanismo de generación del MVB dependiente de los complejos ESCRT** la agrupación de los complejos ESCRT I y II en los TEMs inician la invaginación de la membrana para formar las ILV e interactúan con las proteínas Hrs y Vps27 para introducir proteínas monoubiquitinadas en el exosoma. La ubiquitinación de proteínas es una señal que las marca como destino las ILV, aunque existen otras moléculas como el MHC II cuyo transporte a las ILV no está condicionado por la ubiquitinación.

ESCRT III es reclutado vía Alix y se une a la subunidad de ESCRT I. El complejo ESCRT III finaliza la formación de las ILV al cerrar la vesícula y desprenderla de la membrana del MVB mediante la ATPasa Vps4<sup>113,140,348–350</sup>.

Los MVB se pueden generar en ausencia de los complejos ESCRT, lo que pone de manifiesto la existencia de otro **mecanismo de generación del MVB independiente de los complejos ESCRT**. Uno de estos mecanismos implica la segregación y formación de placas lipídicas que contienen esfingolípidos. Posteriormente, sobre estos lípidos actúan las esfingosinomielasas produciendo ceramidas, lo cual es fundamental para la formación de las ILV. Los exosomas generados por estos mecanismos están enriquecidos en esfingolípidos, ceramidas y placas lipídicas compuestas por colesterol<sup>351</sup>.

La liberación de los exosomas al espacio extracelular se produce por fusión del MVB con la membrana plasmática de la célula. El primer paso que se produce es el acoplamiento del MVB con la membrana plasmática, mediado por proteínas Rab, entre las que destacan RAB11, RAB35, RAB27A y RAB27B. Mientras que RAB11 y RAB35 se asocian con el acoplamiento de endosomas inmaduros y de reciclaje, RAB27A y RAB27B se asocian con endosomas tardíos más maduros y con mayor capacidad secretora<sup>352</sup>. RAB27B participa en tráfico de vesículas desde el aparato de Golgi al MVB y de movilizar el MVB hacia la membrana plasmática y RAB27A tienen la función de anclar el MVB para su fusión con la membrana<sup>353</sup>. La fusión del MVB a la membrana plasmática requiere de proteínas SNARE, v-SNARE (*vesicular-SNARE*) en el MVB y t-SNARE (*target-SNARE*) en la membrana celular. La fusión del MVB es dependiente de VAMP7, que es una proteína SNARE que se asocia a la ATPasa vacuolar y que aportan la energía necesaria para la fusión de las membranas<sup>354,355</sup>.



**Figura 10. Esquema de la biogénesis y liberación de las VE** (modificado de Teng & Fussenegger, *Advanced Science*, 8, 2003505, 2021<sup>116</sup>).

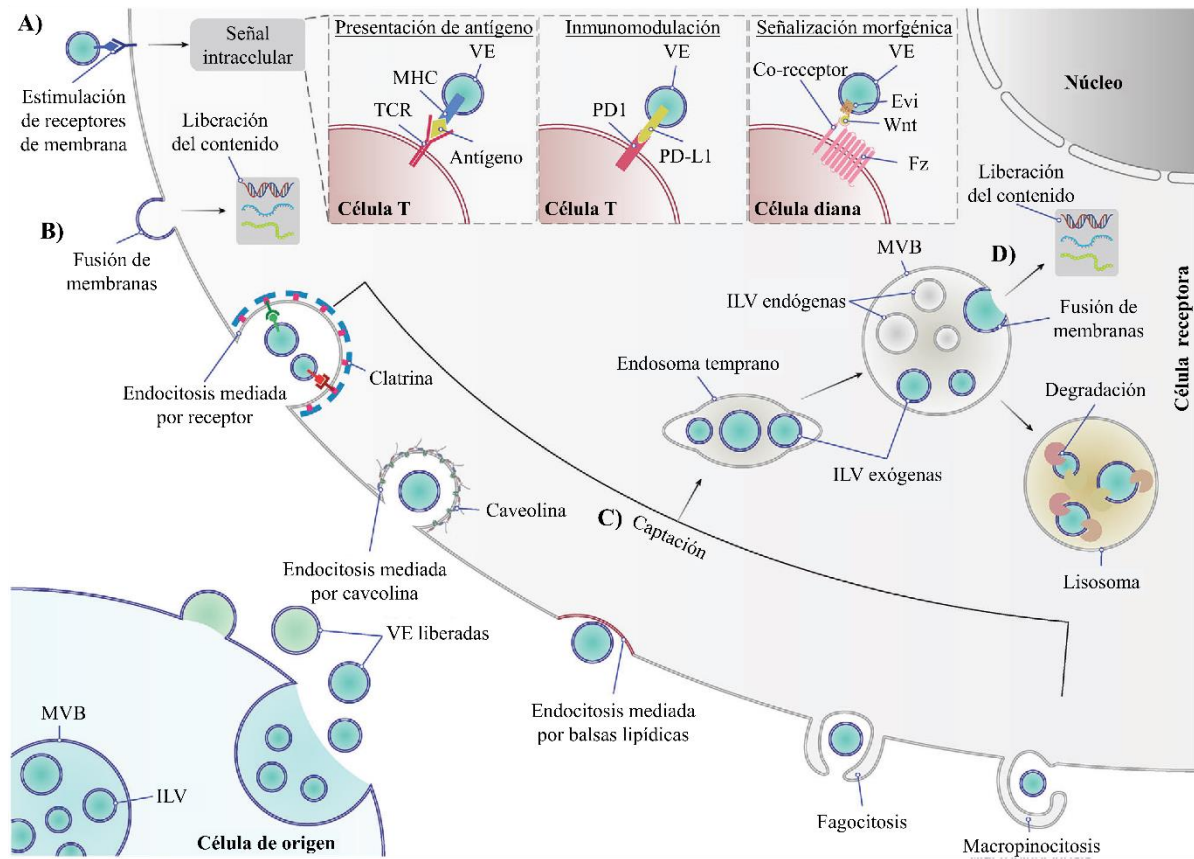
Debido al proceso de formación de los exosomas, la doble invaginación, estos presentan en su superficie moléculas que estaban presentes en la superficie de la célula que los libera, lo cual permite determinar su origen<sup>117</sup>. Algunos de estos marcadores de origen serían la molécula de adhesión celular L1 (L1CAM, del inglés *L1 Cell Adhesion Molecule*) cuando proceden de neuronas<sup>118,119</sup>, CD3 de linfocitos T, CD19 de linfocitos B<sup>120</sup> o CD41 de megacariocitos y plaquetas<sup>121</sup>.

## 5.2. Funciones de las vesículas extracelulares. Comunicación intercelular

En las últimas décadas se han atribuido diversas funciones a las VE, desde vehículo de desecho para eliminar metabolitos o sustancias de desecho, hasta funciones reguladoras del sistema inmunitario en diferentes compartimentos corporales. Las VE tienen un papel dual, promoviendo estados patológicos o revirtiéndolos. Estas vesículas ejercen un papel diferente según las células que las libera, la célula diana o el tejido donde actúan.

Las VE median la comunicación intercelular y sus funciones asociadas mediante dos mecanismos principales: 1) transferir información a la célula diana por estimulación de sus receptores de superficie a través de ligandos presentes en la superficie de las VE (Figura 11A), o 2) transferir información a la célula diana al liberar proteínas y ácidos nucleicos en el interior de la célula diana (Figura 11B)<sup>116</sup>. La estimulación de receptores de membrana de la célula diana activa vías de señalización intracelulares. Los ligandos presentes en las VE dependen en gran medida del tipo y estado fisiológico de la célula que los genere, como los MHC presentes en VE derivadas de APC, implicados en la presentación de antígenos (ver apartado 5.2.1.1 de Introducción).

Las VE también pueden ejercer su función al verter su contenido en la célula diana, activando receptores y vías de señalización intracelulares<sup>116</sup>. La internalización del contenido de las VE en la célula diana se puede realizar por fusión directa de las VE con la membrana plasmática (Figura 11B) o por su internalización mediante diferentes mecanismos de endocitosis (Figura 11C). La fusión directa de las VE con la membrana plasmática libera su contenido al citoplasma directamente. La endocitosis de las VE puede producirse por diferentes mecanismos: por endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, endocitosis mediada por balsas lipídicas, fagocitosis o macropinocitosis<sup>223,224</sup>. Las VE del endosoma pueden fusionarse con la membrana del endosoma para liberar su contenido al citoplasma de la célula diana (Figura 11D). El endosoma también puede fusionarse con MVB de la célula diana, creando MVB heterogéneos con ILV propias y otras procedentes de otras células; este último mecanismo ha sido propuesto como uno de los mecanismos por el cual las células endoteliales de la BHE transfieren VE desde sangre periférica al interior del SNC<sup>142</sup>.



**Figura 11. Esquema de la internalización de las VE y su señalización en receptores de superficie de la célula diana** (modificado de Teng & Fussenegger, *Advanced Science*, 8, 2003505, 2021<sup>116</sup>).

### 5.2.1. Vesículas extracelulares y sistema inmunitario

Los exosomas pueden mediar una acción estimuladora o supresiva de la respuesta inmunitaria, en procesos de autoinmunidad o patologías infecciosas, presentando un papel dual. La activación de las células inmunitarias regula la liberación de exosomas, ya que la interacción de células dendríticas y linfocitos B con células T, así como la activación del TCR en células T, incrementa la liberación de exosomas por parte de estas células inmunes<sup>122-124</sup>. Exosomas derivados de células dendríticas presentan MHC I y II en su superficie, que se une a los receptores de células T, induciendo una respuesta inmunitaria adaptativa al activar células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup><sup>125</sup>. Exosomas de células dendríticas inmaduras reducen la respuesta inmunitaria adaptativa al inducir apoptosis en células T, promoviendo tolerancia inmunogénica como la observada en modelos animales de autoinmunidad<sup>356</sup>. Los exosomas también pueden influenciar el balance entre células T pro- o anti-inflamatorias, pudiendo inducir la diferenciación de estas células hacia fenotipos efectores Th17 y Th1 o fenotipos Th2 y Tregs<sup>126</sup>. Los exosomas liberados por células epiteliales, como las intestinales, también se ha demostrado que ejercen un papel en la presentación de antígenos durante condiciones inflamatorias, ya que

bajo la estimulación de IFN- $\gamma$ , estas células son capaces de sintetizar MHC II que se presentará en los exosomas liberados<sup>31,357</sup>.

Las funciones de los exosomas en la regulación del sistema inmunitario se llevan a cabo mediante: 1) transferencia y presentación de antígenos peptídicos, 2) transferencia de ADN, 3) modulación de la expresión genética mediante transferencia de ARN y 4) activación de vías de señalización en la célula diana.

#### **5.2.1.1. Vesículas extracelulares en la transferencia y presentación de antígenos a las células T**

Ha sido ampliamente demostrada la existencia de MHC, moléculas co-estimuladoras y moléculas de adhesión en VE procedentes de diversos tipos celulares, lo que sugiere que estas vesículas pueden participar en la presentación de antígenos y estimulación de las células T. Existen diferentes mecanismos por los cuales las VE participan en la presentación de antígenos: por presentación directa de antígeno, presentación indirecta por transferencia del antígeno o presentación indirecta por transferencia del complejo MHC-antígeno.

En la **presentación directa de antígeno** las VE procedentes de APC mantienen los MHC I y MHC II en su superficie, pudiendo estimular directamente a células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> respectivamente. La activación de las células T por parte de estas VE libres es poco eficaz en comparación a la ejercida por APC, probablemente pudiendo estimular solo células de memoria<sup>127-129</sup>. Esta baja estimulación es resultado de las escasas interacciones del MHC con el TCR y de moléculas co-estimuladoras, ya que el pequeño tamaño de las VE y su dispersión no facilita un mayor número de estas interacciones. En estudios *in vitro*, cuando se inmovilizan VE derivadas de APC en altas concentraciones sobre esferas de látex o cuando se aumenta artificialmente el número de complejos MHC-antígeno en las VE, se consigue incrementar la activación de las células T en cultivo, al incrementarse las interacciones entre las VE y las células T<sup>127,358</sup>. La capacidad de estimulación de las VE libres, incluyendo la estimulación de células naïve, se puede incrementar con la interacción de las VE con APC. Se ha demostrado que las VE son capaces de unirse a la superficie de las APC y desplazarse por la superficie de la membrana de forma similar a las proteínas transmembrana unidas al citoesqueleto, lo que sugiere que esta unión está mediada por ligandos o moléculas de adhesión presentes en la superficie de las VE que interactúan con receptores de la célula diana<sup>359</sup>. La unión de las VE a las APC conlleva la fijación de estas vesículas, facilitando su concentración e impidiendo su difusión, y junto a la mayor presencia de moléculas co-estimuladoras por parte de las APC, se

facilita un mayor número de interacciones entre el MHC de las VE y el TCR de células T, promoviendo su activación<sup>137</sup>. Células dendríticas tratadas con LPS (células dendríticas maduras) liberan exosomas que presentan mayor cantidad de MHC II, CD86 e ICAM1 y mayor potencial de activar células T que exosomas derivados de células inmaduras<sup>130,358,360</sup>. Este aumento del potencial estimulador es consecuencia, en parte, del mayor contenido en ICAM1, que incrementa la unión de las vesículas a las APC. Por otra parte, los exosomas derivados de células dendríticas maduras pueden ser captados por células incapaces de presentar antígenos y proporcionarles la capacidad de activar células T naïve<sup>360</sup>. Las células dendríticas inmaduras son más eficientes internalizando las VE que las células maduras, mientras que estas células maduras retienen más VE en su superficie<sup>130</sup>.

Durante la **presentación indirecta por transferencia del antígeno** las VE transportan antígenos en sus MHC y son internalizadas por células dendríticas. Las células dendríticas son capaces de degradar el complejo MHC-antígeno de las VE y usarlo como una fuente alternativa de péptidos antigénicos para estimular células T al presentar los péptidos antigénicos en sus propios MHC<sup>130,131</sup>.

En el mecanismo de **presentación indirecta por transferencia del complejo MHC-antígeno** las VE son internalizadas y sus complejos MHC-antígeno son presentados en la superficie de las APC, sin necesidad de ser modificados o sintetizados *de novo* por la célula receptora. Experimentos *in vitro* llevados a cabo con células dendríticas deficientes en MHC II e incubadas con exosomas que portaban complejos MHC II-antígeno demostraron que estas células eran capaces de estimular la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>, por lo que los complejos MHC-antígeno procedían de las VE y no de las células dendríticas. Aun así, el máximo nivel de estimulación de las células T CD4<sup>+</sup> en estos experimentos se producía con células dendríticas normales, sugiriendo que parte de la estimulación de las células T estaba mediada por presentación del péptido antigénico cargado en moléculas de MHC II de la propia célula dendrítica (presentación indirecta por transferencia del antígeno)<sup>132</sup>.

### 5.2.1.2. Vesículas extracelulares en la transferencia de ADN

El ADN citosólico es indicativo de procesos tumorales o de infección por virus o bacterias intracelulares. La vía cGAS-STING detecta ADN en el citosol y su activación conlleva la expresión de genes inflamatorios y respuesta tipo 1 que conlleva reclutamiento de monocitos y su diferenciación a monocitos pro-inflamatorios, liberación de citocinas, reclutamiento de



células NK, activación de células dendríticas y polarización de linfocitos hacia subpoblaciones Th1 y Th17, todo ello para hacer frente al daño. Exosomas liberados por células infectadas pueden transportar ADN que active la vía cGAS-STING que conlleve la activación de genes inflamatorios<sup>114</sup>.

#### **5.2.1.3. Vesículas extracelulares en la modulación de la expresión genética mediante transferencia de ARN**

Las VE puede transportar gran variedad de ácidos nucleicos como ADN, ARNm y miARN. Los ARN contenidos en las VE quedan protegidos de las ARNasas, por lo que su dispersión y funcionalidad en la célula receptora es mayor. Se ha detectado que el patrón de mRNA y miARN de VE difiere de la célula de origen, lo que sugiere que existe cierta preferencia en encapsular secuencias de ARN específicos<sup>361,362</sup>.

En VE encontramos predominantemente ácidos nucleicos tipo miRNA, que son funcionales y pueden modular la expresión de genes en la célula diana; además, se ha propuesto que los MBV son compartimentos donde se concentran los componentes de las vías de miARN y los miARN maduros<sup>133,134</sup>. Los exosomas pueden transferir ARNm en rara ocasión, pero este evento se incrementa en modelos animales por la activación y proliferación de células inmunes que producen estos exosomas durante procesos de inflamación aguda y crónica<sup>222</sup>. Estos ARNm pueden ser traducidos a proteínas en la célula receptora<sup>363</sup>, pero la abundancia de regiones 3'-no traducidas en estos transcritos sugiere que tienen una función más reguladora que como molde para la síntesis de proteínas<sup>135</sup>.

#### **5.2.1.4. Vesículas extracelulares en la activación de vías de señalización en la célula diana**

Las VE portan en su superficie o en su interior moléculas capaces de unirse a receptores de superficie o intracelulares de la célula diana, activando diferentes vías de señalización.

Citocinas como la IL-1 $\beta$  son transportadas en el interior de las VE y liberadas en el interior de la célula diana<sup>364,365</sup>. Moléculas de la superfamilia del TNF- $\alpha$  se transportan preferiblemente unidas a la superficie de la vesícula; esto previene su degradación por proteasas de superficie, aumenta su concentración local en el medio extracelular y favorece su función biológica<sup>136,137</sup>. La presencia en VE de ligandos específicos puede mediar procesos inflamatorios o autoinmunes, como en la artritis reumatoide, donde VE derivadas de plasma o derivadas de fibroblastos sinoviales de estos pacientes presentaban mayor contenido en TNF- $\alpha$  en superficie

en comparación con los controles sanos. Este TNF- $\alpha$  hacía que las células T activadas fueran resistentes a la apoptosis, contribuyendo a la patogénesis de la artritis reumatoide mediada por células T<sup>138</sup>. El contenido de las VE también puede ejercer un efecto anti-inflamatorio, por ejemplo, Álvarez *et al.* demostraron que el TGF- $\beta$  contenido en VE derivadas de células madre mesenquimales del endometrio era capaz de inhibir la generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores tras una activación fisiológica de estas células, regulando el estado inflamatorio de estas<sup>139</sup>.

### 5.2.2. Vesículas extracelulares e infecciones víricas y bacterianas

Los exosomas median parte de la respuesta inmunitaria frente a bacterias al fomentar la presentación de antígenos bacterianos a través de exosomas derivados de macrófagos. De este modo podrían influenciar la respuesta inmunitaria adaptativa al estimular la producción de IFN- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , y exosomas derivados de macrófagos cargados con interleucinas promoverían la maduración de las células dendríticas y la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, además de regular la producción de interleucinas por parte de los macrófagos<sup>218-220</sup>. Otro mecanismo mediante el cual los exosomas participan en la inmunidad frente a bacterias es la transferencia del material genético bacteriano; el ADN de bacterias intracelulares es cargado en exosomas, liberado, y es capaz de activar la vía cGAS-STING en la célula receptora<sup>114</sup>. En el caso de infecciones por *Listeria*, este proceso conlleva la supresión de la actividad de células T y por consiguiente una reducción en la inmunidad frente a la bacteria. También existen vías que detectan ARN bacteriano y que su activación activa la inmunidad frente a bacterias, como en macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, que liberan exosomas cargados con ARN bacteriano que activan vías de detección de ARN en macrófagos diana, promoviendo su acción fagocitaria<sup>366</sup>.

Los exosomas y su maquinaria de síntesis también se han descrito como un mecanismo que promueve la infección viral, ya que pueden diseminar los componentes del virus y la internalización de los virus por parte de los exosomas fomentaría su supervivencia y favorecería la entrada en la célula receptora<sup>367,368</sup>. Por ejemplo, células T CD4<sup>+</sup> infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) liberan exosomas que contienen la proteína Nef, proteína que induce la apoptosis en otras células T<sup>369</sup>. La acción de los miARN también puede favorecer las infecciones virales, ya que células infectadas con el VIH liberan el miRNA TAR en sus VE, aumentando la susceptibilidad de las células que las internalizan en ser infectadas<sup>370</sup>.

### 5.2.3. Vesículas extracelulares y cáncer

En cáncer, los exosomas presentan un papel dual, pudiendo mejorar o empeorar la situación patológica. En modelos animales se ha observado que el ADN genómico contenido en exosomas derivados de células tumorales es capaz de activar la vía cGAS-STING en células dendríticas, promoviendo la respuesta antitumoral e inhibiendo el crecimiento del tumor<sup>371,372</sup>. El empaquetamiento del ADN en exosomas también favorece su eliminación y regula la sobreactivación de esta vía y la producción de especies reactivas del oxígeno<sup>373</sup>. Por el contrario, la diseminación del ADN tumoral mediante exosomas puede empeorar la patología, ya que estos exosomas pueden ser captados por neutrófilos e inducir la producción de IL-8, que promueve la inflamación asociada a cáncer<sup>374</sup>.

Diversos miARN contenidos en exosomas derivados de células tumorales también pueden favorecer la progresión del cáncer. El miR-212-3p exosomal derivado de células cancerígenas inhibe el factor de transcripción RFXAP, que regula la producción de MHC II, promoviendo la evasión del sistema inmunitario por parte de las células cancerígenas<sup>375</sup>. De forma similar, el miR-222-3p termina por promover la polarización a fenotipos anti-inflamatorios de estos monocitos vía STAT3<sup>376</sup>. Los miR-21 y miR-29a exosomales de células tumorales son capaces de activar NF- $\kappa$ B vía TLR7/8 en macrófagos, produciendo IL-6 y TNF- $\alpha$ <sup>377</sup>.

La modulación del sistema inmunitario por exosomas también se puede llevar a cabo por la acción de ligandos en su superficie. Exosomas de células tumorales mediante PD-L1 suprimen la actividad antitumoral de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, inhiben la maduración de células dendríticas y su migración y la función de las células T, promoviendo el crecimiento tumoral<sup>378-380</sup>. El ligando FasL en exosomas derivados de melanoma o cáncer de próstata también tienen un efecto patológico, induciendo la apoptosis de las células T<sup>381</sup>. Los exosomas también juegan un papel anti-tumoral mediante sus ligandos de superficie, como es el caso de exosomas derivados de mastocitos, que presentan en su superficie MHC II, CD86, LFA-1 e ICAM-1 que inducen la proliferación de células T y B<sup>382</sup>. Las VE pueden transferir antígenos de células tumorales que pueden ser captados por las APC y utilizados para estimular células T CD8<sup>+</sup><sup>383</sup>. La inyección intradérmica de exosomas derivados de APC que presentaban MHC II junto a péptidos tumorales promovieron el retraso en el crecimiento y la erradicación del tumor en modelos animales, lo que pone de manifiesto que los péptidos introducidos generaron una respuesta antitumoral en los animales<sup>384</sup>.

### 5.3. Vesículas extracelulares y sistema nervioso central

En el SNC los exosomas son secretados por neuronas, microglía y astrocitos tanto en condiciones normales como patológicas y se encuentran en cerebro y líquido cefalorraquídeo. Las funciones que se atribuyen a las VE en el SNC son la comunicación celular, como vehículo para eliminar sustancias tóxicas o de desecho, en el crecimiento de las neuritas, supervivencia neural, formación de la vaina de mielina, neurotransmisión, etc<sup>140</sup>.

En relación con la neurotransmisión, se ha demostrado que varios tipos neuronales participan en las sinapsis excitatorias al transferir a las neuronas proteínas esenciales para la neurotransmisión. Se ha encontrado que células gliales, bajo condiciones de alta actividad neural o estrés celular, liberan VE cargados con sinapsina, una proteína asociada a vesículas sinápticas implicada en el desarrollo neural, y que estas VE son capaces de aumentar la supervivencia de las neuronas y el crecimiento de las neuritas<sup>385</sup>. Por otra parte, también se ha demostrado que las VE de células de microglía estimulan la actividad sináptica al mejorar el metabolismo de ceramidas y esfingosina en la neurona receptora, incrementando la neurotransmisión<sup>386</sup>.

Las VE también juegan un papel en la neuroprotección, ya que los astrocitos, en respuesta a estrés oxidativo o hipertermia, liberan VE cargados con Hsp70 (*Heat Shock Protein 70*), las cuales incrementan la supervivencia de las neuronas<sup>387</sup>.

Por otra parte, las VE también juegan un papel en el desarrollo o mantenimiento de condiciones patológicas del SNC, como en la patogénesis de enfermedades neuroinflamatorias, neurológicas o neurodegenerativas<sup>140</sup>. La mediación de estos efectos patológicos se puede deber a la transferencia de su contenido en miARN, proteínas y lípidos, así como la interacción de sus ligandos de superficie con la célula diana.

En relación con la enfermedad neurocognitiva asociada a VIH, denominada HAND (*HIV-Associated Neurocognitive Disorder*), bajo la infección de VIH y administración de morfina, los astrocitos liberan VE con el miARN-29b, el cual empeora la función neural al suprimir la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas-B (PDGF-B, del inglés *Platelet-Derived Growth Factor-B*). Niveles altos del miARN-29b y bajos de PDGF-B se han encontrado en ganglios basales de macacos infectados con el virus de la inmunodeficiencia de simios y dependientes de morfina, reforzando la idea de que el miARN-29b mediaría la patología neurocognitiva<sup>388</sup>.

Las VE también tienen un papel en la fisiopatología de las proteinopatías del SNC. Las proteinopatías del SNC se producen por agregación de proteínas anómalas que no adquieren una estructura terciaria adecuada en el interior de las células que acaban produciendo la muerte neuronal. Algunas de estas proteínas son la  $\alpha$ -sinucleína en Parkinson, la proteína priónica celular en enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o la proteína Tau y  $\beta$ -amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Los exosomas pueden actuar eliminando estas proteínas de las neuronas, impidiendo su agregación y protegiendo la función celular. Por otra parte, este mismo mecanismo favorece la diseminación de estas proteínas anómalas, contribuyendo a la patología<sup>389-391</sup>. Algunas de estas proteínas, como la proteína Tau y  $\beta$ -amiloide, se han encontrado en exosomas derivados de líquido cefalorraquídeo en pacientes con enfermedad de Alzheimer y derivados del sobrenadante de cultivos de microglía de ratón y de líneas celulares de humano y ratón<sup>392,393</sup>. Otro hecho que refuerza el papel de las VE en la diseminación de estas proteínas es la acumulación de niveles altos de Alix y flotillin-1 alrededor de placas amieloides en cerebros de pacientes con Alzheimer<sup>394</sup>. También se ha encontrado  $\alpha$ -sinucleína patológica en exosomas derivados de líquido cefalorraquídeo en pacientes con Parkinson y en estudios *in vitro*, exosomas cargados con  $\alpha$ -sinucleína patológica provocaban muerte neuronal<sup>395</sup>. Tratamientos farmacológicos en estudios *in vitro* que inhibían la generación de MVB disminuyeron la propagación de la proteína priónica celular, mientras que tratamientos que promovían la generación de MVB aumentaron la propagación de estas proteínas anómalas, reforzando la idea del papel de las VE en la patogénesis de la enfermedad mediante la transferencia de estas proteínas<sup>396</sup>. Además de la participación en la diseminación de estas proteínas anómalas, Bellingham *et al.* demostraron que las VE derivadas de neuronas infectadas con proteínas priónicas contenían un patrón de miARN alterado, caracterizado por una elevada expresión de miARN asociados a enfermedades neurológicas como los miARN-29b, miARN-128a y miARN-146a, los cuales podrían empeorar la patología.

También se ha observado la presencia de la glicoproteína mielínica de oligodendrocitos en exosomas derivados de oligodendrocitos, un auto-antígeno implicado en la esclerosis múltiple<sup>397</sup>.

### **5.3.1. Impacto de la inflamación periférica en el sistema nervioso central mediado por vesículas extracelulares**

Conocido ya el papel inmunomodulador que pueden tener las VE, cabe preguntarse si estas vesículas son capaces de atravesar la BHE desde la periferia y actuar en las células del SNC.

## Introducción

Algunos estudios demuestran que VE derivadas de células dendríticas contienen ARN de interferencia eficaces en el tratamiento de modelos animales para la enfermedad de Alzheimer, por lo que estas VE serían capaces de atravesar la BHE y actuar sobre células específicas<sup>141</sup>.

El estudio de la BHE mediante modelos *in vitro* se realiza con modelos celulares que consisten en una monocapa de células endoteliales microvasculares de cerebro (BMEC, del inglés *Brain Microvascular Endothelial Cells*) que forman un tapiz. Esta monocapa de células confluye y cubre completamente la superficie del cultivo, generando uniones estrechas y uniones adherentes entre las células como las que se presentan en los endotelios de la BHE. Generalmente, este tapiz se cultiva en pocillos tipo *transwell*, que son pocillos de fondo poroso donde se sitúan las células de cultivo; estos pocillos a su vez se acoplan sobre una placa de pocillos estándar que se cubre con medio de cultivo que atraviesa la superficie porosa. Con este modelo se puede evaluar la integridad de la monocapa y la permeabilidad a través de ella de células, moléculas u otros componentes como las VE.

Mediante la utilización de este modelo Chen *et al.*<sup>142</sup> comprobaron que los exosomas eran capaces de atravesar el tapiz de BMEC por difusión pasiva por los huecos entre células sin necesidad de utilización de energía, proceso llamado ruta paracelular. Por otra parte, existen otros mecanismos en los cuales las BMEC captan exosomas por endocitosis mediada por caveolina y mediada por clatrina y los liberan a la otra parte del tapiz activamente mediante exocitosis, proceso llamado ruta transcelular. Esta ruta transcelular es el proceso más relevante en el paso de los exosomas a través de las BMEC. Además, el aumento de la permeabilidad de la BHE por factores como TNF- $\alpha$  o IL-17, induce una mayor captación de exosomas por parte de las BMEC<sup>142,143</sup>.

En condiciones de inflamación periférica, las VE de células mononucleares pueden transportar moléculas como proteínas, lípidos o miARN que atraviesen la BHE y podrían alterar la función neuronal al fusionarse con las neuronas o alterar las vías de señalización por medio de sus ligandos de superficie<sup>141,398</sup>.

### **5.3.2. Vesículas extracelulares en modelos de encefalopatía hepática**

Se han realizado estudios con el fin de analizar el papel de las VE en los mecanismos por los que la hiperamonemia induce cambios en el cerebro<sup>144</sup>. El modelo animal de donde se aislaron las VE en estos estudios fue un modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático en ratas, a las que se induce la hiperamonemia moderada similar a la de los pacientes cirróticos por una

dieta rica en acetato amónico<sup>145</sup>. Este modelo de hiperamonemia reproduce en gran medida las alteraciones presentes en pacientes con EH.

La incoordinación motora en hiperamonemia crónica se produce por incremento del TNF- $\alpha$  en el cerebelo, que activa el receptor TNFR1, incrementando los niveles de NF- $\kappa$ B y glutaminasa en microglía y la liberación de glutamato al espacio extracelular. El aumento de los niveles de glutamato incrementa la captación de sodio y la activación en astrocitos, que invierte la función del transportador de GABA 3 (GAT3, del inglés *GABA transporter 3*), aumentando los niveles de GABA extracelular y produciendo la incoordinación motora<sup>146,399</sup>.

Con el fin de analizar el papel de las VE en los mecanismos de hiperamonemia, se aislaron VE de ratas hiperamonémicas, se inyectaron de forma intravenosa a ratas control y se evaluó si estas reproducían los cambios en neuroinflamación de cerebelo e incoordinación motora presentes en las ratas hiperamonémicas.

Las VE de ratas hiperamonémicas contenían niveles mayores de TNF- $\alpha$  y el receptor de TNF- $\alpha$  TNFR1, moléculas implicadas en el mecanismo que produce incoordinación motora por alteración de la neurotransmisión en cerebelo<sup>146</sup>. Las VE inyectadas eran capaces de llegar al SNC desde sangre periférica, inducir incoordinación motora y producir neuroinflamación caracterizada por incremento de activación de la microglía en la capa molecular y sustancia blanca del cerebelo, aumento de la expresión de NF- $\kappa$ B en microglía, activación de astrocitos y aumento de los marcadores de neuroinflamación en cerebelo, como CD68, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

La inyección de VE de ratas hiperamonémicas a ratas control producía incoordinación motora, reproduciendo los mecanismos neuroinflamatorios observados en ratas hiperamonémicas, lo que sugiere que las VE transmiten las moléculas necesarias para inducir la incoordinación motora en hiperamonemia y EHM. Algunas de las moléculas más relevantes en VE que podrían mediar la inducción de incoordinación motora fueron el TNF- $\alpha$  y TNFR1, aunque otras proteínas transportadas por las VE en hiperamonemia también podrían contribuir.

### **5.3.3. Aplicación en diagnóstico**

Los exosomas se encuentran en todos los fluidos biológicos y son secretados por la mayoría de las células, lo cual les hace un elemento idóneo en el estudio en biopsias líquidas mínimamente invasivas, ya que se pueden aislar de saliva, orina o sangre. La composición de estas estructuras está condicionada por el estado fisiológico de la célula que los origina, lo cual les convierte en una herramienta potencial en el diagnóstico y la terapia de diversas enfermedades<sup>114</sup>.

## Introducción

El contenido en miARNs en exosomas ha sido extensamente estudiado como biomarcador de diversas enfermedades, sobre todo cáncer, donde se ha encontrado un patrón de miARN característico en estas vesículas<sup>148</sup>. El contenido de las VE está relacionado con el estado fisiológico de la célula que lo origina, por lo que una alteración en dicho tipo celular conllevará una alteración en el contenido de las vesículas<sup>147</sup>. Las VE presentan proteínas que nos ayudan a reconocer su origen celular (ver apartado 5.1 de Introducción), por lo que mediante técnicas específicas se pueden purificar VE procedentes de un tejido o tipo celular de interés. Este concepto ayuda a analizar el contenido proteico y de ácidos nucleicos de VE específicas, las cuales pueden servir como diagnóstico del estado fisiológico de dichas células o como biomarcador de patologías relacionadas. Basándose en esta premisa, existen estudios donde se aislaron y purificaron VE derivadas de neuronas a partir de plasma de sujetos seropositivos para VIH con o sin deterioro neurológico. Al analizar el contenido proteico de HMGB1 (*High mobility group box 1*), del neurofilamento ligero (NF-L) y de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), proteínas relacionadas con el daño neural, se observó que los pacientes con deterioro neurológico presentaban un incremento en el contenido de estas proteínas en VE derivadas de neuronas aisladas de plasma, diferencia que no se observaba al analizar las vesículas totales aisladas de plasma<sup>118,119</sup>. Otras investigaciones también identificaron diferencias en el contenido proteico en VE derivadas de neuronas, donde se observó un aumento de la proteína  $A\beta$  y una disminución de neurogranina, sinaptofisina, sinaptotagmina y sinaptopodina en pacientes con deterioro cognitivo leve respecto a sujetos sanos<sup>217</sup>. Estos estudios refuerzan la idea del potencial de las VE para ser utilizadas como biomarcador de patologías, con especial interés en un diagnóstico temprano de alteraciones del SNC, ya que este es de difícil acceso y los métodos actuales como la punción lumbar son muy invasivos.







### **III. HIPÓTESIS**



Estudios anteriores postulan que el deterioro cognitivo asociado a pacientes con EHM está producido por la actuación sinérgica entre hiperamonemia e inflamación periférica. La hiperamonemia y la inflamación periférica pueden transmitirse al cerebro e inducir neuroinflamación y alteraciones en la neurotransmisión, produciendo el deterioro cognitivo leve. Los cambios en el sistema inmunitario y los elementos que los median no se conocen del todo. Unos posibles mediadores de este proceso podrían ser las VE, de las cuales se ha descrito que tienen una función importante en la comunicación intercelular y están implicadas en enfermedades que cursan con inflamación periférica y neuroinflamación como la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer.

En base a estas premisas, las hipótesis planteadas en este estudio son:

1. Alteraciones en el inmunofenotipo de linfocitos T y B, así como cambios en su expresión génica y contenido proteico, podrían ser los causantes de la inflamación periférica y facilitarían la inducción de la neuroinflamación.
2. El contenido proteico en las VE de plasma de pacientes con EHM está alterado y contribuiría a los cambios en el sistema inmunitario que desencadenan la EHM.
3. Los cambios en el inmunofenotipo y contenido de vesículas extracelulares también podrían ser un buen biomarcador de la EHM, permitiendo un diagnóstico temprano de la enfermedad y mejorando su tratamiento.



## **IV. OBJETIVOS**





El **objetivo** de esta tesis es estudiar si las VE aisladas de plasma de pacientes cirróticos con EHM juegan un papel en la inducción de la inflamación y las alteraciones cognitivas asociadas a la EHM, así como en la diferenciación alterada de los subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que presentan estos pacientes. Un segundo objetivo es caracterizar los cambios en el inmunofenotipo de linfocitos B y T, y en la expresión génica y proteica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y evaluar el papel de estos cambios en la inducción de la inflamación periférica asociada a estos pacientes.

**Objetivos específicos:**

- 1) Determinar la prevalencia de la EHM y evaluar las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes con EHM mediante test psicométricos específicos.
- 2) Caracterizar los cambios en el inmunofenotipo de linfocitos B y T mediante citometría de flujo, analizando los cambios las proporciones de las poblaciones de linfocitos B y T CD4<sup>+</sup>, tanto de fenotipos naïve como efectores.
- 3) Caracterizar la expresión génica de citocinas y receptores mediadores de la inflamación en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.
- 4) Aislar y caracterizar las VE de plasma de controles y pacientes cirróticos sin y con EHM:
  - Análisis del origen celular de las VE mediante diferentes marcadores de células inmunitarias y nerviosas.
  - Análisis del contenido proteico de las VE analizando el contenido en moléculas implicadas en la activación del sistema inmunitario, inflamación y metabolismos del amonio.
- 5) Evaluar si las VE aisladas de plasma de pacientes sin y con EHM y controles juegan un papel en la inducción de la inflamación y la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en pacientes con EHM.
- 6) Correlacionar los parámetros inmunológicos estudiados con las alteraciones cognitivas y motoras asociadas a la EHM.
- 7) Evaluar la utilidad de la determinación de los cambios en el inmunofenotipo y del contenido proteico de VE aisladas de plasma en el diagnóstico de la EHM.



## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. Pacientes y controles**

En este estudio se reclutaron 131 pacientes con cirrosis hepática en los Servicios de Medicina Digestiva del Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia. La cirrosis hepática se diagnosticó mediante biopsia hepática o por una combinación de parámetros clínicos, analíticos y radiológicos. En el estudio también se incluyeron 43 sujetos sanos como grupo control, los cuales no presentaban ninguna enfermedad hepática, inflamatoria o neurológica. Todos los participantes fueron incluidos en el estudio tras firmar el consentimiento informado. Los protocolos del estudio fueron aprobados por los Comités Éticos del Hospital Clínico Universitario de Valencia (Anexos). Los procedimientos seguidos se ajustaron a las directrices éticas de la Declaración de Helsinki.

### **1.1. Criterios de inclusión y exclusión**

Los criterios de inclusión para los pacientes fueron:

- Mayores de 18 años.
- Cualquier etiología de cirrosis hepática.
- Cualquier grado de función hepática.

Los criterios de exclusión para los pacientes fueron:

- Deterioro cognitivo resultante de otra patología neuropsiquiátrica.
- Consumo de alcohol en los últimos 6 meses.
- Insuficiencia hepática avanzada (índice MELD > 25).
- Episodios previos de EH clínica.
- Diagnóstico de hepatocarcinoma.

### **1.2. Extracción de sangre**

Todos los pacientes y controles fueron citados en el Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Clínico Universitario de Valencia para una extracción de sangre en ayunas y seguidamente la realización de test psicométricos.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos BD Vacutainer de 6 mL con EDTA como agente anticoagulante (BD Bioscience; Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) para la

obtención de plasma y en tubos BD Vacutainer de 8 mL sin EDTA y agar (BD Bioscience) para la obtención de suero.

El último tubo de suero se recogió sin garrote para medir los niveles de amonio en sangre inmediatamente después de ser obtenido (ver apartado 2 de Materiales y Métodos).

También se recogió sangre en un tubo BD Vacutainer de 2,5 mL con EDTA (BD Bioscience) como agente anticoagulante para el estudio de subpoblaciones de linfocitos B en sangre total por citometría de flujo (ver apartado 6.1 de Materiales y Métodos).

## **2. Determinación de los niveles de amonio en sangre**

La determinación de los niveles de amonio en sangre se realizó a partir de 20  $\mu\text{L}$  de sangre total con un detector *Ammonia Checker II* (Arkay Factory, Inc; Kioto, Japón). La sangre de dicho tubo se extrajo sin garrote para evitar la formación de micro-coágulos que alteran la medida. La medida se realizó inmediatamente después de obtener la muestra, ya que la concentración de amonio aumenta a medida que transcurre el tiempo.

Este aparato utiliza tiras reactivas (*Ammonia Test Kit II*; Arkay Factory, Inc) que contienen una superficie receptora, otra indicadora y un separador poroso. La superficie receptora de la muestra está compuesta por ácido bórico e hidróxido sódico y la indicadora por verde de bromocresol. Se aplica la muestra en la parte receptora (Figura 12A), donde los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) pasan a amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) al reaccionar con el tampón borato. Este gas pasa por los poros del distanciador hasta la parte indicadora, donde el amoniaco reacciona con el verde de bromocresol produciendo color de manera proporcional a la cantidad de iones amonio iniciales en la muestra. Pasados 180 segundos tras poner la muestra se retira el distanciador (Figura 12B) y se introduce la parte indicadora en el aparato (Figura 12C), el cual nos indica la concentración de amonio en  $\mu\text{M}$  (Figura 12D). El rango de detección del aparato es de 7 a 286  $\mu\text{M}$ .

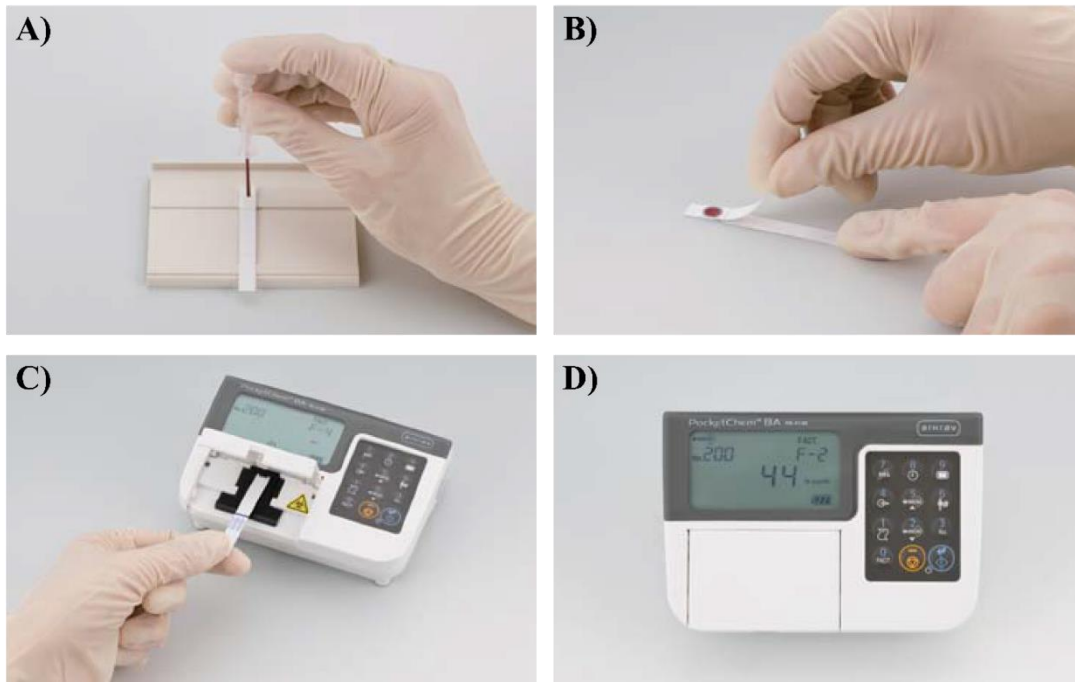


Figura 12. Procedimiento de medida de amonio en sangre total mediante aparato *Ammonia Checker II* (Arkray Factory, Inc).

### 3. Obtención de muestras de suero y plasma

Las muestras de sangre se recogieron en tubos BD Vacutainer de 6 mL con EDTA como agente anticoagulante (BD Bioscience) para la obtención de plasma y en tubos BD Vacutainer de 8 mL sin EDTA (BD Bioscience) y agar para la obtención de suero.

Ambos tipos de muestras se centrifugaron a 1.700 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante de los tubos, se realizaron alícuotas de los dos tipos de muestras y se conservaron a 80 °C bajo cero hasta el momento de uso.

Varias muestras con EDTA no procesadas se destinaron al aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (ver apartado 5 de Materiales y Métodos).

### 4. Test psicométricos

Los test psicométricos se realizaron posteriormente a la extracción de sangre. Tanto pacientes como controles se ubicaron en una sala específica con el fin de minimizar estímulos o distracciones que pudieran alterar su rendimiento en dichos test. Los test realizados fueron el PHES (ver apartado 4.1 de Materiales y Métodos), para el diagnóstico de la EHM en los pacientes, y otros test psicométricos más específicos para el estudio de alteraciones cognitivas y motoras (ver apartados 4.2 y 4.3 de Materiales y Métodos respectivamente).

## **4.1. Clasificación de los pacientes mediante la batería PHES**

Con el fin de diagnosticar la EHM y clasificar a los pacientes cirróticos se utilizó la batería de test psicométricos PHES (Figura 13). Los controles también realizaron dicha batería para descartar la presencia de deterioro cognitivo leve medido por el PHES. Esta batería es considerada como el “*gold*” estándar para el diagnóstico de la EHM en pacientes con enfermedad hepática<sup>19,149</sup>. Esta batería está compuesta por 5 subtest, que evalúan la velocidad motora, percepción visual, orientación visuo-espacial, concentración, atención y en menor medida la memoria. Para la realización de dicha batería se requiere buena atención, lo que fue un argumento para no incluir otros test que evaluaban la atención<sup>149</sup>.

Los subtest que conforman el PHES son:

### **4.1.1. Test de dígitos y símbolos**

El test de dígitos y símbolos (DST, del inglés *Digit Symbol Test*) evalúa la velocidad de procesamiento y la memoria de trabajo. El test se basa en una tabla de referencia donde cada número (del 1 al 9) está asociado a un símbolo diferente (Figura 13A). El sujeto tiene 90 segundos para dibujar el símbolo que corresponda debajo del número basándose en la tabla de referencia. Se realiza una prueba previa para que el sujeto entienda el test y se familiarice con los símbolos. Se registra el número de ítems realizados correctamente.

### **4.1.2. Test de conexión numérica A**

El test de conexión numérica A (NCT-A, del inglés *Number Connection Test-A*) evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. El test consiste en una serie de números (del 1 al 25) repartidos aleatoriamente por la hoja, donde el sujeto tiene que unir los números mediante líneas en orden ascendente (1-2-3...23-24-25) (Figura 13B). Previamente se realiza una prueba en la que el sujeto debe realizar exactamente este test, pero con los números dispuestos de otra forma. Se registra el tiempo, en segundos, que se tarda en finalizar la tarea.

### **4.1.3. Test de conexión numérica B**

El test de conexión numérica B (NCT-B, del inglés *Number Connection Test-B*) evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. El test consiste en una serie de números (del 1 al 13) y letras (de la A a la L) repartidos aleatoriamente por la hoja (Figura 13C). El sujeto tiene que unir los ítems alternando entre números y letras, uniéndolos en orden ascendente y



las letras en orden alfabético (1-A-2-B...K-12-L-13). Se registra el tiempo, en segundos, que se tarda en finalizar la tarea.

#### **4.1.4. Test de puntos seriados**

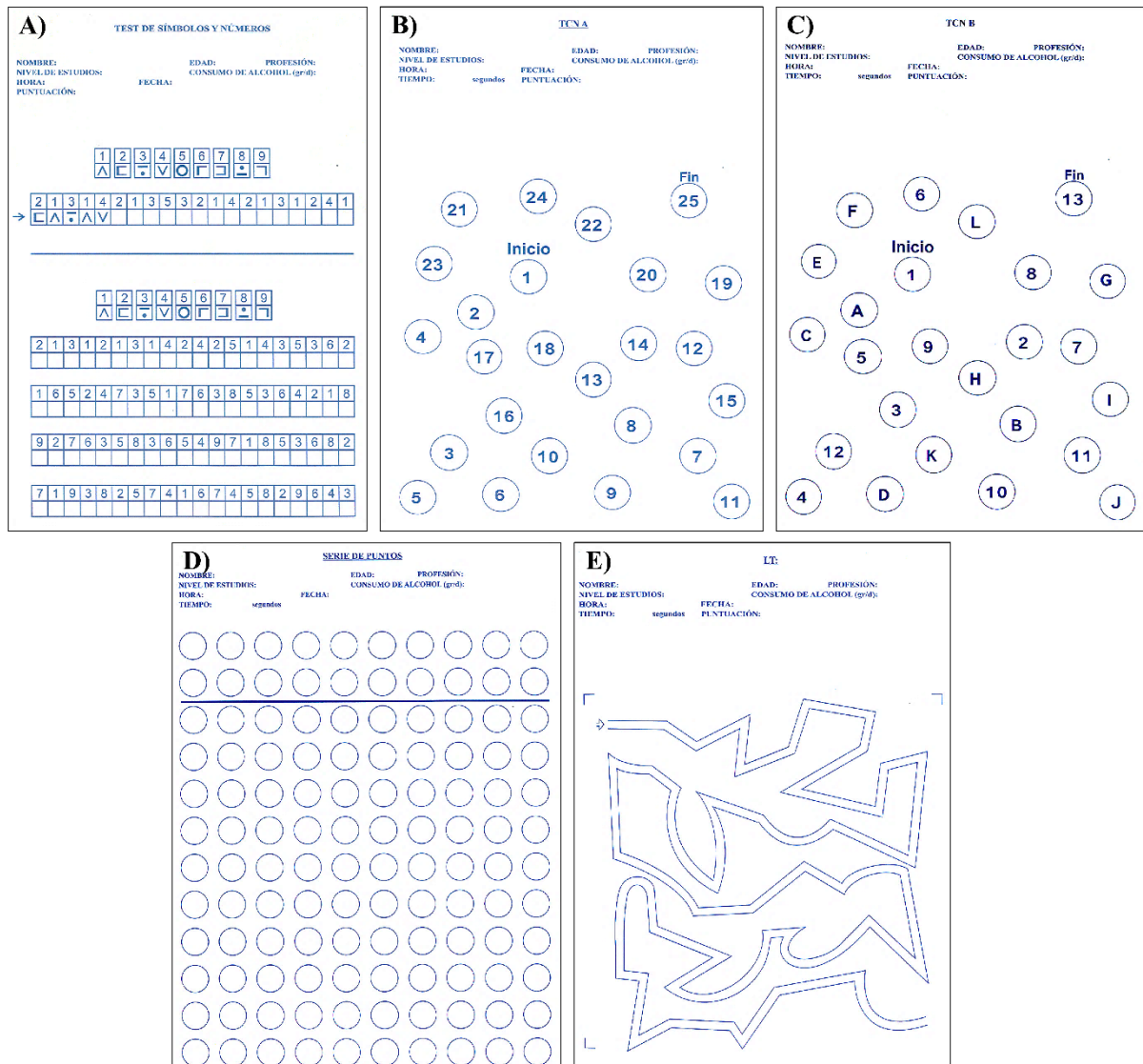
El test de puntos seriados (SDT, del inglés *Serial Dotting Test*) evalúa la coordinación visuo-espacial. El test consiste en una serie de círculos donde el sujeto debe colocar un punto lo más céntrico posible dentro de los círculos (Figura 13D). Previamente se realiza una prueba con dos filas de círculos. Se registra el tiempo, en segundos, que se tarda en finalizar la tarea.

#### **4.1.5. Test de línea quebrada**

El test de línea quebrada (LTT, del inglés *Line Tracking Test*) evalúa la coordinación visuo-espacial. El test consiste en un recorrido limitado por dos líneas paralelas, con tramos rectos, curvos y giros bruscos o curvos (Figura 13E). El sujeto debe seguir dicho recorrido con un rotulador intentando no tocar las paredes ni salirse. Este test se corrige con una plantilla, la cual tiene el mismo recorrido más ancho y dividido en cuadrados. Los errores se calculan en base al número de cuadrados recorridos en la plantilla x1 si toca la pared del recorrido del test, x2 si se sale de la pared del recorrido del test, y x3 si se sale de las paredes del recorrido de la plantilla. Se registra el tiempo, en segundos, que se tarda en finalizar la tarea y se suma el total de errores para obtener la puntuación de la prueba.

#### **4.1.6. Cálculo de la puntuación PHES**

Para la obtención de la puntuación PHES se utilizó una aplicación web: [http://www.redeh.org/TEST\\_phes.htm](http://www.redeh.org/TEST_phes.htm). En esta aplicación se introduce la edad del sujeto, el nivel de estudios expresado en años dentro del sistema educativo y la puntuación obtenida en cada subtest. Con estos datos, y mediante un ajuste por edad y nivel de estudios y utilizando unos valores de referencia para la población española normal<sup>150</sup>, se puntúa cada subtest con números enteros, tanto positivos como negativos dependiendo del éxito al realizar el test. La suma de estas puntuaciones nos da la puntuación PHES, que marca un punto de corte para el diagnóstico de la EHM: si  $PHES \leq -4$  el paciente se clasifica como con EHM. Con este punto de corte se consigue una sensibilidad del 96% y especificidad del 100% en el diagnóstico<sup>400</sup>.



**Figura 13. Batería de test psicométricos PHEs. A) Test de dígitos y símbolos. B) Test de conexión numérica A. C) Test de conexión numérica B. D) Test de puntos seriados. E) Test de línea quebrada.**

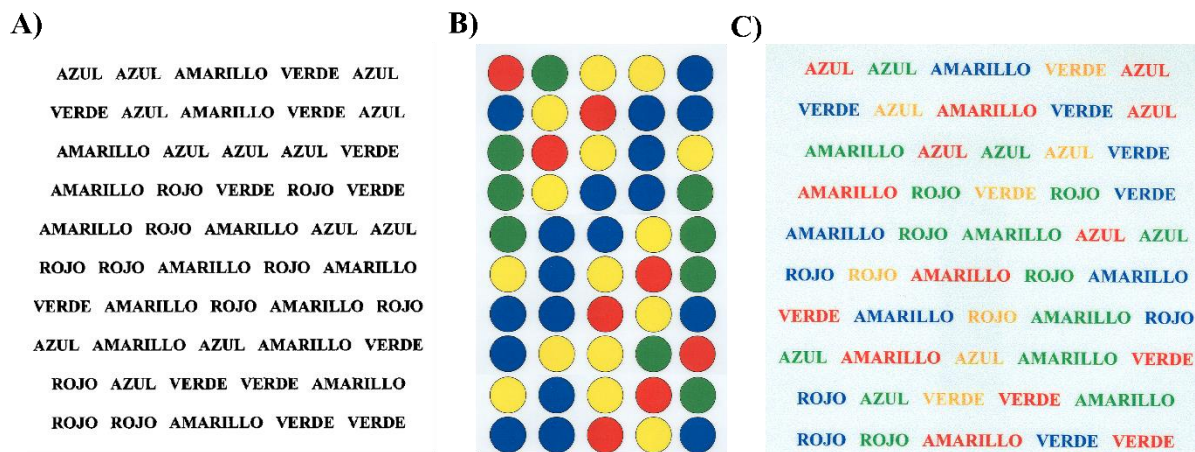
## 4.2 Estudio de alteraciones cognitivas mediante test psicométricos

### 4.2.1. Test Stroop

El test de Stroop<sup>151</sup> es un test ampliamente utilizado en exámenes psicológicos y para el estudio de diferentes patologías neuropsicológicas como puede ser trastorno por déficit de atención con hiperactividad o dislexia. Este test evalúa la atención selectiva, velocidad de procesamiento y sistemas de inhibición de una respuesta automatizada<sup>152,153</sup>.

Realización del test: el test consta de tres subtest, cada uno con un tipo de ítems diferentes:

- Tarea congruente (Figura 14A): los ítems que se presentan son palabras que designan colores (azul, amarillo, verde y rojo) escritas en tinta negra. El sujeto tiene que leer tantas palabras como sea posible en 45 segundos siguiendo el orden en la hoja.
- Tarea neutra (Figura 14B): los ítems que se presentan son círculos de colores (azul, amarillo, verde y rojo). El sujeto tiene que nombrar tantos colores como sea posible en 45 segundos siguiendo el orden en la hoja.
- Tarea incongruente (Figura 14C): los ítems que se presentan son palabras que designan colores, pero impresas en una tinta diferente a la del color que nombran. El sujeto tiene que indicar el color de la tinta de cada palabra como sea posible en 45 segundos siguiendo el orden en la hoja.



**Figura 14. Test Stroop. A) Tarea congruente. B) Tarea neutra. C) Tarea incongruente.**

Corrección y puntuación: de este test se obtienen tres puntuaciones directas: número de palabras (P), número de colores (C) y número de palabras-colores (PC), cada una correspondiente a cada tarea. De estas puntuaciones directas se obtienen las puntuaciones corregidas al sumar un valor constante a las puntuaciones directas según rangos de edad (Tabla 4)<sup>154</sup>.

**Tabla 4. Corrección por edad de los parámetros del test Stroop.**

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

Las puntuaciones directas corregidas se utilizan para obtener las puntuaciones definitivas (puntuaciones T), que se interpolan en una tabla de normalidad para la población española<sup>155</sup>.

### 4.2.2. Test oral de claves

Este test evalúa la atención selectiva y la velocidad de procesamiento<sup>156</sup>.

Realización del test: al sujeto se le muestra una tabla de nueve símbolos, cada uno asociado a un número (del 1 al 9). En este test al sujeto se le entrega una plantilla con símbolos y tiene que decir en voz alta el número que corresponda a cada símbolo basándose en la tabla de referencia (Figura 15). El test dura 90 segundos. Previamente se realiza una prueba del test para que el individuo entienda el test y se familiarice con los símbolos.

Corrección y puntuación: se registra el número total de ítems realizados, los aciertos y los errores.

CLAVE								
⊂	÷	⊥	⊄	⊋	>	+	)	÷
1	2	3	4	5	6	7	8	9

⊂	⊋	÷	⊂	⊥	>	÷	⊄	⊂	>	÷	⊂	>	⊂	÷
⊄	>	⊂	÷	⊋	>	⊥	⊄	⊂	÷	>	÷	⊄	⊥	)
⊄	⊋	+	)	⊂	⊥	+	⊄	)	⊋	÷	÷	⊥	⊄	+
÷	⊄	⊋	⊂	>	⊄	⊂	⊋	>	+	÷	)	⊥	>	⊄
÷	⊋	)	⊥	>	+	⊄	⊋	÷	⊥	+	÷	÷	)	⊂
>	÷	+	÷	⊥	>	⊄	⊂	+	÷	⊋	>	)	⊄	
÷	)	+	÷	⊥	+	)	⊋	⊂	÷	÷	⊂	⊄	⊥	>
⊋	÷	⊂	>	⊄	÷	⊂	>	÷	+	⊥	⊋	⊄	⊥	÷

Figura 15. Test oral de claves.

### 4.2.3. Test oral de dígitos

Este test consta de dos partes: test de dígitos directos y test de dígitos inversos, que evalúan la memoria de trabajo<sup>157,158</sup>.

Realización del test:

- Test de dígitos directos (Figura 16A): el test consta de bloques compuestos por dos series de números aleatorios. El primer bloque empieza por series de dos números y cada bloque aumenta en uno los números de la serie. Al sujeto se le dicen las series de números y este tiene que repetirlos en el mismo orden en el que se le dicen. Cada serie dicha correctamente suma 1 punto. La prueba termina cuando el sujeto falla en las dos series de un bloque.
- Test de dígitos inversos (Figura 16B): el funcionamiento es idéntico al test anterior, el único cambio es que el sujeto tiene que decir los números en el orden inverso al que se le dicen. Cada serie dicha correctamente suma 1 punto. La prueba termina cuando el sujeto falla en las dos series de un bloque.

Corrección y puntuación: la puntuación de cada parte es la suma de series bien realizadas.

A)		B)	
	ORDEN DIRECTO Elemento/Intento	Punt. intento	Puntuación elemento
1	1 1-7	0 1	0 1 2
	2 6-3	0 1	
2	1 5-8-2	0 1	0 1 2
	2 6-9-4	0 1	
3	1 6-4-3-9	0 1	0 1 2
	2 7-2-8-6	0 1	
4	1 4-2-7-3-1	0 1	0 1 2
	2 7-5-8-3-6	0 1	
5	1 6-1-9-4-7-3	0 1	0 1 2
	2 3-9-2-4-8-7	0 1	
6	1 5-9-1-7-4-2-8	0 1	0 1 2
	2 4-1-7-9-3-8-6	0 1	
7	1 5-8-1-9-2-6-4-7	0 1	0 1 2
	2 3-8-2-9-5-1-7-4	0 1	
8	1 2-7-5-8-6-2-5-8-4	0 1	0 1 2
	2 7-1-3-9-4-2-5-6-8	0 1	

	ORDEN INVERSO Elemento/Intento	Punt. intento	Puntuación elemento
1	1 2-4	0 1	0 1 2
	2 5-7	0 1	
2	1 6-2-9	0 1	0 1 2
	2 4-1-5	0 1	
3	1 3-2-7-9	0 1	0 1 2
	2 4-9-6-8	0 1	
4	1 1-5-2-8-6	0 1	0 1 2
	2 6-1-8-4-3	0 1	
5	1 5-3-9-4-1-8	0 1	0 1 2
	2 7-2-4-8-5-6	0 1	
6	1 8-1-2-9-3-6-5	0 1	0 1 2
	2 4-7-3-9-1-2-8	0 1	
7	1 9-4-3-7-6-2-5-8	0 1	0 1 2
	2 7-2-8-1-9-6-5-3	0 1	

Figura 16. Test oral de dígitos. A) Test de dígitos directos. B) Test de dígitos inversos.

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

Este test evalúa la memoria de trabajo de una forma más exigente, ya que es más complejo que el test de dígitos (Figura 17)<sup>157</sup>.

Realización del test: este test consta de bloques formados por 3 series de ítems, compuestos por números y letras aleatorias. Cada bloque aumenta en uno los ítems de la serie. Al sujeto se

le dicen las series y debe recordar los ítems para decirlos en un orden concreto: primero los números, ordenados de menor a mayor, y luego las letras, ordenadas alfabéticamente.

Corrección y puntuación: Cada serie dicha correctamente suma 1 punto. La prueba termina cuando el sujeto falla en las tres series de un bloque.

Intento	Elemento	Respuesta correcta	Punt. intento	Puntuación elemento			
1	1	L-2 2-L	0 1	0	1	2	3
	2	6-P 6-P	0 1				
	3	B-5 5-B	0 1				
2	1	F-7-L 7-F-L	0 1	0	1	2	3
	2	R-4-D 4-D-R	0 1				
	3	H-1-8 1-8-H	0 1				
3	1	T-9-A-3 3-9-A-T	0 1	0	1	2	3
	2	V-1-J-5 1-5-J-V	0 1				
	3	7-N-4-L 4-7-L-N	0 1				
4	1	8-D-6-G-1 1-6-8-D-G	0 1	0	1	2	3
	2	K-2-C-7-S 2-7-C-K-S	0 1				
	3	5-P-3-Y-9 3-5-9-P-Y	0 1				
5	1	M-4-E-7-Q-2 2-4-7-E-M-Q	0 1	0	1	2	3
	2	W-8-H-5-F-3 3-5-8-F-H-W	0 1				
	3	6-G-9-A-2-S 2-6-9-A-G-S	0 1				
6	1	R-3-B-4-Z-1-C 1-3-4-B-C-R-Z	0 1	0	1	2	3
	2	5-T-9-J-2-X-7 2-5-7-9-J-T-X	0 1				
	3	E-1-H-8-R-4-D 1-4-8-D-E-H-R	0 1				
7	1	5-H-9-S-2-N-6-A 2-5-6-9-A-H-N-S	0 1	0	1	2	3
	2	D-1-R-9-B-4-K-3 1-3-4-9-B-D-K-R	0 1				
	3	7-M-2-T-6-F-1-Z 1-2-6-7-F-M-T-Z	0 1				

Figura 17. Test oral de letras y números.

#### 4.2.5. Test d2

El test d2 permite estudiar las capacidades de atención selectiva-sostenida y concentración mental, ya que evalúa la capacidad de los sujetos para prestar atención a estímulos de interés mientras se ignoran otros irrelevantes a lo largo de la prueba<sup>159-161</sup>. Además de estos parámetros, el test de d2 también nos permite evaluar otros como velocidad de procesamiento y la precisión en el procesamiento mental.

Realización del test: el test consta de una hoja con 14 filas con 47 ítems cada una, que pueden ser “d” o “p” acompañados de una a cuatro pequeñas rayas en la parte inferior, superior o ambas (Figura 18A y 18B). En este test existen dos tipos de ítems: los relevantes, “d” con dos pequeñas rayas (dos en la parte superior o inferior o una en cada parte) (Figura 18C); y los irrelevantes, el resto de ítems (todas las “p” independientemente de las rayas que tengan y las “d” con una, tres o cuatro rayas). El sujeto tiene 20 segundos para marcar los ítems relevantes de cada fila empezando por la parte izquierda y se realiza en todas las filas.

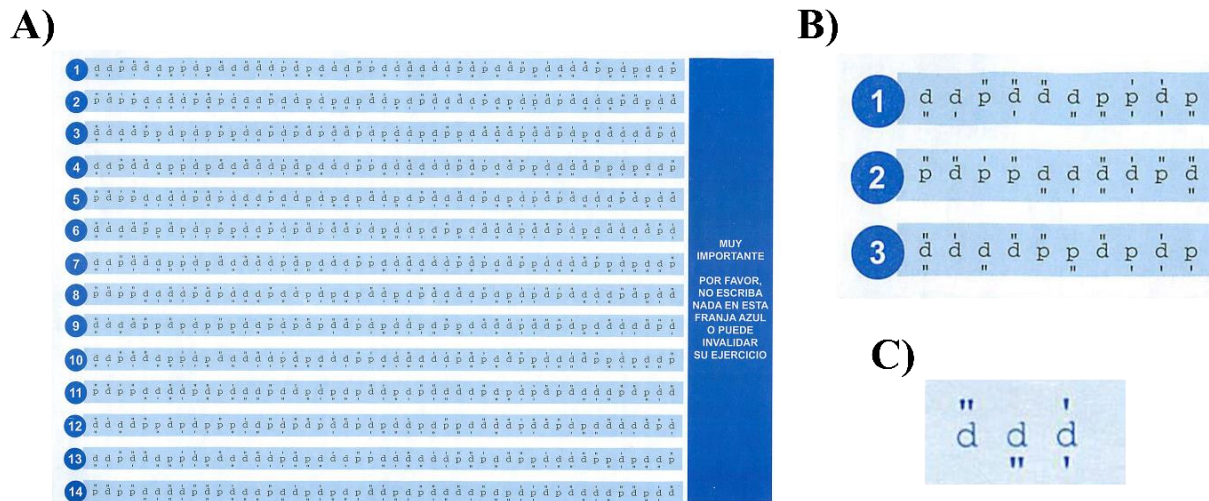


Figura 18. Test d2. A) Test d2 completo. B) Detalle de filas. C) Ítems relevantes.

Corrección y puntuación: de esta prueba obtenemos varios parámetros:

- Total de respuestas (TR): es el número de la casilla en la cual el sujeto marca el último ítem de cada línea. La suma de las TR de las 14 filas nos permite evaluar la velocidad de procesamiento y el total de trabajo realizado en el test.
- Total de aciertos (TA): es el número total de ítems relevantes marcados en cada fila. La suma de los TA de las 14 filas nos permite evaluar la precisión del procesamiento.
- Errores por omisión (O): es el número total de ítems relevantes no marcados hasta el último ítem marcado. La suma de todos los O nos permite evaluar de forma indirecta la precisión del procesamiento.
- Errores por comisión (C): número de ítems irrelevantes marcados hasta el último ítem marcado. La suma de los C nos permite evaluar la precisión del procesamiento.
- Índice de efectividad (TOT): es un índice que se calcula a partir de la TR, C y O totales:  $TOT = TR - (O + C)$ . Este índice nos permite evaluar la relación entre velocidad y precisión en la prueba.
- Índice de concentración (CON): este índice se calcula a partir del TA y C totales:  $CON = TA - C$ . Este índice nos permite evaluar la concentración del sujeto durante la prueba.

### 4.3. Estudio de alteraciones motoras

#### 4.3.1. Test de coordinación bimanual

Realización del test: la tarea consiste en el manejo de un tablero con perforaciones distribuidas en ocho filas con una separación sin perforaciones en medio del tablero, dividiéndolo en dos

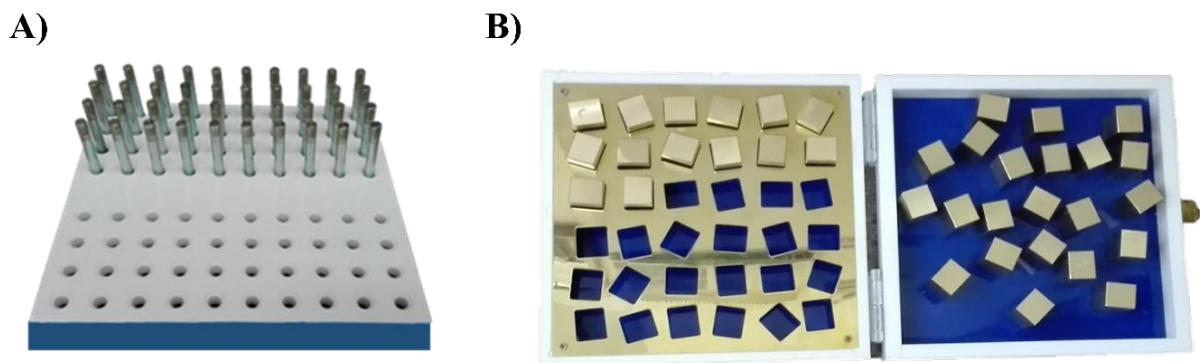
grupos de cuatro filas (Figura 19A). Dentro de una parte del tablero hay insertadas clavijas que hay que pasar a la otra parte de forma simultánea utilizando las dos manos y empezando por los extremos hasta el centro de la fila. El sujeto debe pasar las clavijas de una fila a la misma posición en la otra parte del tablero, es decir, la primera fila a la primera fila y así sucesivamente. Luego se devuelven las clavijas a la posición inicial de la misma forma en la que se han movido (utilizando ambas manos y empezando por la fila de clavijas movidas en último lugar). Este ciclo se repite una vez más. Se mide el tiempo que se tarda en cada pase de clavijas<sup>162</sup>.

Corrección y puntuación: se suman los segundos que se tardan en todos los ciclos y el resultado se expresa en minutos.

### **4.3.2. Test de coordinación visuo-motora**

Realización del test: este test consiste en una matriz de 6 x 6 huecos rectangulares donde el sujeto debe encajar unos prismas rectangulares (Figura 19B). Los prismas son idénticos, pero los huecos tienen orientaciones diferentes, lo que añade dificultad al test. La forma de colocar los prismas es de izquierda a derecha empezando por la primera fila y siempre con la mano dominante. Este proceso se realiza dos veces y se mide el tiempo que se tarda en realizar el test<sup>163</sup>.

Corrección y puntuación: Se suma el tiempo de realización en minutos de las dos repeticiones.



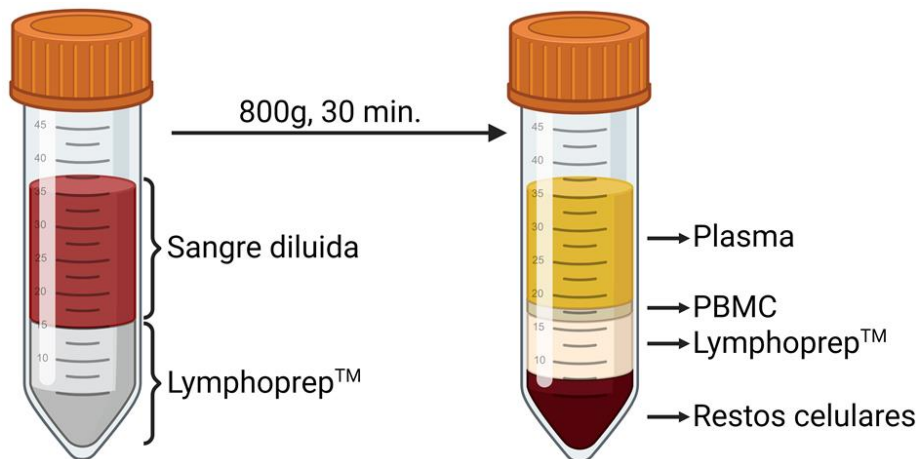
**Figura 19. Test de coordinación motora. A) Test de coordinación bimanual. B) Test de coordinación visuo-motora.**



## 5. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Las PBMC son un conjunto de células formado por linfocitos T y B y monocitos. Estas células están caracterizadas por poseer un único núcleo redondeado, a diferencia de los granulocitos, con núcleos lobulados, o eritrocitos, sin núcleo.

El método empleado para la separación es el gradiente de densidad mediante Lymphoprep™ (Palex Medical SA; Barcelona, España), creando cuatro capas (de arriba abajo): plasma, halo de PBMC, Lymphoprep™ y restos celulares formados por eritrocitos y granulocitos (Figura 20).



**Figura 20. Gradiente de densidades creado con Lymphoprep™ y centrifugación para el aislamiento PBMC a partir de sangre total.**

Para este aislamiento se utilizó sangre total con EDTA. Esta sangre se mezcla con NaCl 0,9% estéril en una proporción 1:1 en un tubo estéril de 50 mL, homogeneizando la mezcla por inversión. Un volumen de 6 mL de esta mezcla se añade lentamente a un tubo de 15 mL con 3 mL de Lymphoprep™ (Palex Medical SA). Se centrifugan los tubos a 800 g durante 30 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga con rotor basculante, sin freno ni aceleración.

Tras finalizar la centrifugación se recoge el plasma de la parte superior, se realizan diferentes alícuotas de 5 mL y se almacena a 80 °C bajo cero. Este plasma resultante del gradiente de densidades se destinó para el aislamiento de VE (ver apartado 9 de Materiales y Métodos).

Se recogen los halos de PBMC en un tubo de 50 mL y se enrasa hasta 45 mL con PBS (Biowest; Newry y Mourne, Reino Unido) con el fin de lavar los restos de Lymphoprep™ (Palex Medical SA). Se centrifugan los tubos a 1.300 g durante 10 minutos. El sedimento celular resultante se

## *Materiales y métodos*

resuspende en medio RPMI (Biowest), se transfiere a un tubo de 15 mL y se enrasa hasta 10 mL. Se homogeniza esta suspensión y se retiran 10  $\mu$ L, que se diluyen con otros 10  $\mu$ L de azul tripán (Sigma-Aldrich; San Luis, Misuri, Estados Unidos) y se introducen 10  $\mu$ L de esta mezcla en una cámara cuentaglóbulos de Neubauer (Marienfeld Superior; Lauda-Königshofen, Alemania) para el posterior recuento celular. Para dicho recuento celular se utiliza un microscopio invertido de contraste de fases Leica DM IL LED (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania), en el que se contabilizan las células vivas (aquellas no teñidas por el azul tripán) en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer, se obtiene el valor promedio, y se multiplica por el factor de dilución del azul tripán (x2) y por el valor de una constante (x10.000) para obtener la concentración de células viables de la suspensión en células/mL. También se contabilizan las células muertas (teñidas por el azul tripán) para calcular la viabilidad celular.

Una vez se conoce el número total de PBMC en la muestra, se calcula el volumen para separar 3 millones de PBMC, que se destinan al estudio de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre total por citometría de flujo (ver apartado 6.2 de Materiales y Métodos). El resto de suspensión se centrifuga a 500 g durante 4 minutos para continuar con el proceso de criopreservación.

Si el sedimento celular resultante presenta coloración roja, es decir, aún hay presencia de eritrocitos, se realiza un lisado de eritrocitos. Para la lisis de eritrocitos se resuspende el sedimento celular en 2 mL de *BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer* (BD Biosciences) y se incuba durante 1 minuto en oscuridad, seguidamente se centrifuga a 500 g durante 4 minutos.

Se resuspende el sedimento celular en una mezcla de suero bovino fetal (SBF) inactivado (Gibco; Waltham, Estado Unidos) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a razón de 5 millones de PBMC/mL. Se distribuye 1 mL de esta suspensión en crioviales para criopreservar las células.

La criopreservación se realiza de forma progresiva en un Mr.Frosty (Nalgene; Waltham, Estado Unidos) previamente lleno de isopropanol. Una vez resuspendidas las células en 10% de DMSO en SBF inactivado, se llenan los crioviales, se depositan en el Mr.Frosty y se llevan a 80 °C bajo cero. De esta forma las células se congelan de forma gradual, bajando 1 °C cada minuto. Pasadas 24h los crioviales se retiran del Mr.Frosty y se almacenan en nitrógeno líquido para mantener su viabilidad a largo plazo.

## **6. Estudio de subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo**

La citometría de flujo es una técnica que se basa en la clasificación de células en función de su morfología o marcadores específicos, presentes tanto en la superficie celular como en el interior de la célula. En ella se utilizan anticuerpos unidos a fluorocromos que se unen a marcadores específicos de las células. Las células en suspensión se hacen pasar de una en una por un colector, donde son atravesadas por láseres. El láser se dispersa al pasar por las células y provoca la activación de la fluorescencia de los fluorocromos, dando lugar a señales de tamaño y volumen celular (FS, del inglés *Forward Scatter*), de su morfología y granulosidad (SS, del inglés *Side Scatter*) y de la fluorescencia emitida por los fluorocromos. La combinación de los parámetros de tamaño, morfología e intensidad de fluorescencia para los marcadores elegidos permiten caracterizar cada célula que pasa por el citómetro.

Para la adquisición de los datos se utilizó el citómetro *Gallios flow cytometer* (Beckman Coulter; Brea, California, Estados Unidos) del Servicio de Citómica de la Universidad de Valencia. El análisis de los datos se realizó mediante el software *Kaluza Analysis Software* (Beckman Coulter).

### **6.1. Estudio de linfocitos B en sangre total por citometría de flujo**

Para el estudio de subpoblaciones de linfocitos B se partió de 100  $\mu$ L de sangre total obtenida en un tubo con EDTA, que se incubaron durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con los anticuerpos de la Tabla 5.

**Tabla 5. Combinación de anticuerpos utilizados en el estudio de linfocitos B en sangre total.** Se muestra la concentración de uso, el fluorocromo asociado y la casa comercial de cada anticuerpo.

Anticuerpo	Concentración	Fluocromos	Casa comercial
CD45	1:20	KO	Beckman Coulter
CD19	1:20	ECD	Beckman Coulter
CD27	1:40	PE/Cy7	Biolegend
CD38	1:40	APC/Fire™750	Biolegend
IgM	1:20	PB	Beckman Coulter
IgD	1:40	FITC	Biolegend
CD69	1:20	PE	Biolegend

KO: Krome Orange; ECD: Electron Coupled Dye; PE/Cy7 PhycoEerythrin-Cyanine7; APC/Fire™750: Allophycocyanin Fire™ 750; PB: Pacific Blue; FITC: Fluorescein IsoTioCyanate; PE PhycoErythrin.

Tras la tinción con los anticuerpos se lava la muestra dos veces con 3 mL de PBS, con centrifugaciones de 5 minutos a 1.000 g cada una. Tras el último lavado se resuspende la muestra en 100 µL de PBS. Con el fin de que los eritrocitos no interfirieran en la adquisición de los datos se realiza una lisis de eritrocitos con 2 mL *BD FACS Lysing Solution 1x* (BD Biosciences). Se incuba la muestra 10 minutos junto a la solución de lisis en oscuridad a temperatura ambiente, se centrifuga a 200 g durante 5 minutos y se resuspende en 300 µL de PBS. Para el recuento total de cada población, expresado como células/µL, se añade a la muestra una vez procesada un volumen de *Flow Count* (Beckman Coulter) igual al volumen inicial de sangre total, en nuestro caso 100 µL, y se pasa esta mezcla por el citómetro.

En la figura 19 se presenta un ejemplo de los pasos en el análisis de linfocitos B mediante el software *Kaluza* (Beckman Coulter). Para el análisis se seleccionan las células que han pasado por el citómetro de forma individual (“Células individuales”) y se identifican los leucocitos como células CD45<sup>+</sup>, dentro de los cuales podemos discriminar por morfología a los linfocitos. Esta población se enfrenta al marcador CD19 para obtener los linfocitos B como células positivas para el CD19. Dentro de esta población de linfocitos B se identifican varias poblaciones de interés (Figura 21):

- Plasmoblastos: células CD27<sup>high</sup>/CD38<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos B (CD19<sup>+</sup>).
- Linfocitos B inmaduros: células CD27<sup>-</sup>/CD38<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos B (CD19<sup>+</sup>).
- Linfocitos B transicionales: células IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos B inmaduros (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>/CD38<sup>+</sup>).

- Linfocitos B maduros: células CD27<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> dentro de la población de linfocitos B (CD19<sup>+</sup>).
- Linfocitos B *naïve*: células IgD<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup> dentro de la población de linfocitos B maduros (CD19<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>).
- Linfocitos B memoria: células CD27<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos B maduros (CD19<sup>+</sup>/ CD27<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>).
- Linfocitos B *unswitched*: células IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos B memoria (CD19<sup>+</sup>/ CD27<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>).
- Linfocitos B *switched*: células CD27<sup>+</sup>/IgM<sup>-</sup>/IgD<sup>-</sup> dentro de la población de linfocitos B memoria (CD19<sup>+</sup>/ CD27<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>).
- Linfocitos B *switched* doble negativas: células CD27<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>/IgD<sup>-</sup> dentro de la población de linfocitos B memoria (CD19<sup>+</sup>/ CD27<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>).

Una vez identificadas las poblaciones, cada una se enfrentó al marcador de activación temprana CD69, para obtener el porcentaje de células activadas en cada población (células CD69<sup>+</sup> dentro de cada población).

## Materiales y métodos

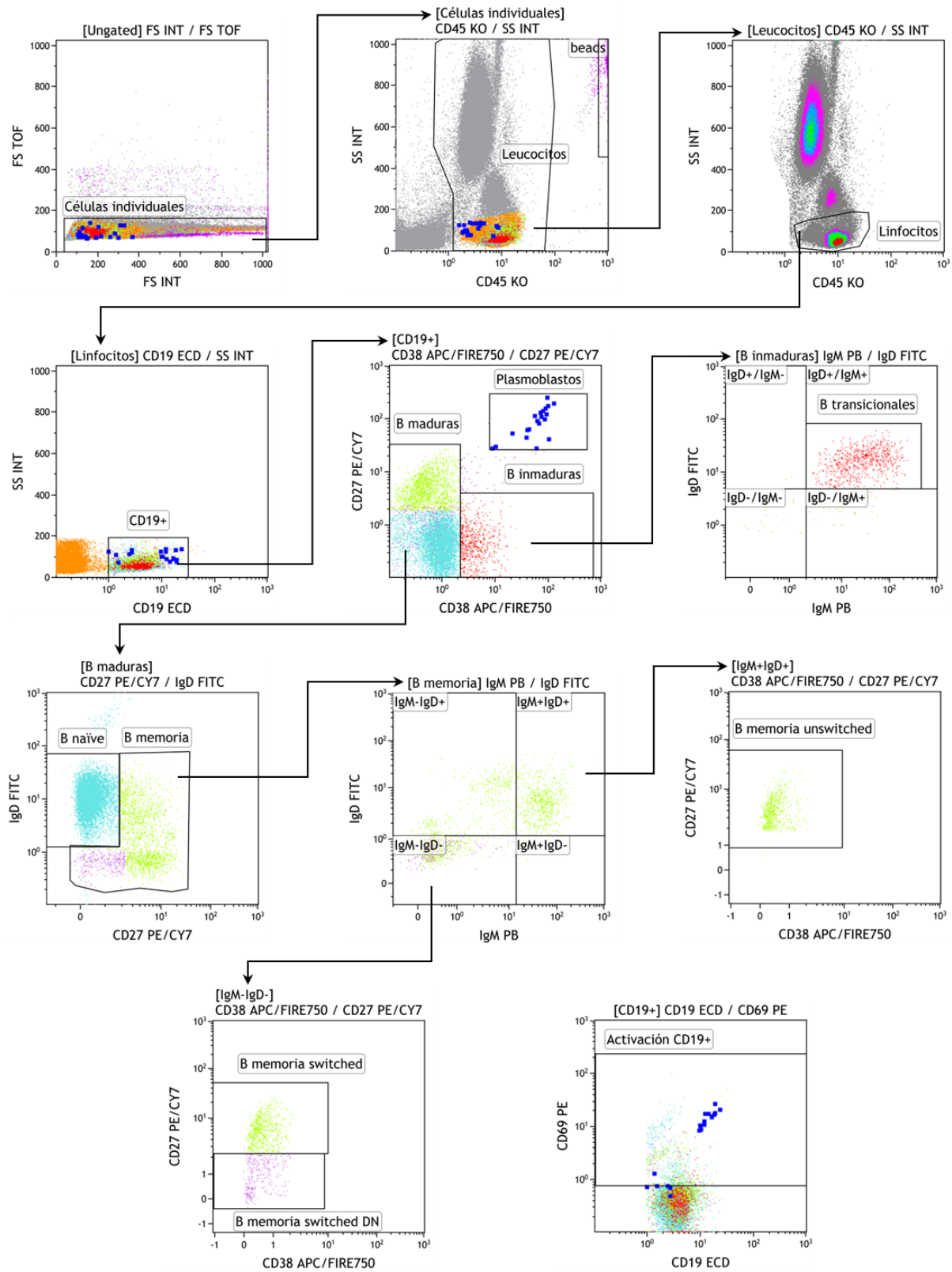


Figura 21. Ejemplo de los pasos seguidos en el análisis de linfocitos B y la activación de las distintas poblaciones mediante el software *Kaluza* (Beckman Coulter).

## 6.2. Estudio de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en PBMC por citometría de flujo

El estudio de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se realizó en muestras de PBMC aisladas el mismo día en el que se obtuvo la sangre del paciente (ver apartado 5 de Materiales y Métodos). La razón por la que se utiliza este tipo de muestra es que las poblaciones de estudio están más concentradas que en sangre total, permitiendo una mejor detección mediante citometría de flujo. Dado que esta muestra ha llevado un procesamiento previo es necesario añadir un marcador de viabilidad, de modo que podamos excluir del análisis las células muertas. Como marcador de viabilidad se utilizó *Zombie Violet™ Fixable Viability Kit* (Biolegend; San Diego, California, Estados Unidos), que se une a las células muertas.

### 6.2.1. Linfocitos Th1, Th2, Th9, Thf y Th22

Una vez aislada la muestra, 300.000 PBMC se lavan con PBS, se centrifugan durante 5 minutos a 1.000 g y se resuspenden en 100 µL de PBS. El primer paso para este estudio es teñir las células con *Zombie Violet™ Fixable Viability Kit* (Biolegend): se diluye el reactivo en proporción 1:1.000 en PBS, se añaden 100 µL a la muestra y se incuba 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrida la incubación se lava con 2 mL de PBS, se centrifuga a 350 g 5 minutos y se resuspende en 100 µL de PBS.

Se incuba la muestra durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con los anticuerpos de la Tabla 6:

**Tabla 6. Combinación de anticuerpos utilizados en el estudio de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en PBMC.** Se muestra la concentración de uso, el fluorocromo asociado y la casa comercial de cada anticuerpo.

Anticuerpo	Concentración	Fluorocromos	Casa comercial
CD4	1:25	ECD	Beckman Coulter
CXCR5	1:40	Alexa Fluor 700	Biolegend
CXCR3	1:10	VioBright FITC	Miltenyi Biotec
CCR4	1:10	PE Vio 770	Miltenyi Biotec
CCR6	1:50	Brilliant Violet 510	Biolegend
CCR10	1:10	PE	Miltenyi Biotec
CD69	1:50	APC Vio770	Miltenyi Biotec

ECD: Electron Coupled Dye; PE: PhycoErythrin; APC: Allophycocyanin.

## Material es y métodos

Tras la tinción con los anticuerpos se lava la muestra dos veces con 3 mL de PBS, con centrifugaciones de 1.000 g de 5 minutos cada una. En el último lavado se resuspende la muestra en 100  $\mu$ L de PBS. Con el fin de que los eritrocitos que puedan quedar en la muestra no interfieran en la adquisición de los datos se realiza una lisis con 2 mL *VersaLyse Lysing Solution* (Beckman Coulter). Para fijar la muestra se utilizó *IOTest 3 Lysing Solution* (Beckman Coulter). Se incubó 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, se centrifuga a 200 g, 5 minutos y se resuspende en 300  $\mu$ L de PBS. Para obtener el dato del recuento celular se utilizó *Flow Count* (Beckman Coulter): se añaden 100  $\mu$ L de este reactivo a la suspensión y se pasa por el citómetro.

En la figura 20 se presenta un ejemplo de los pasos en el análisis de linfocitos Th1, Th2, Th9, Thf y Th22 mediante el software *Kaluza* (Beckman Coulter). Para el análisis se seleccionan las células que han pasado por el citómetro de forma individual (“Células individuales”) y se establece la población de linfocitos por morfología, dentro de los cuales se determinan los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como células positivas para el marcador CD4. A partir de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se identificaron varias poblaciones de interés por combinaciones de los marcadores utilizados (Figura 22):

- Linfocitos Thf: células CCR4<sup>-</sup>/CXCR3<sup>-</sup>/CXCR5<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>).
- Linfocitos Th1: células CCR4<sup>-</sup>/CXCR3<sup>+</sup>/CCR10<sup>-</sup>/CCR6<sup>-</sup> dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>).
- Linfocitos Th9: células CCR4<sup>-</sup>/CCR6<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>).
- Linfocitos Th22: células CCR4<sup>+</sup>/CXCR3<sup>-</sup>/CCR10<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>).
- Linfocitos Th2: células CCR4<sup>+</sup>/CXCR3<sup>-</sup>/CCR10<sup>-</sup>/CCR6<sup>-</sup> dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>).

Una vez identificadas las poblaciones, cada una se enfrentó al marcador de activación temprana CD69, para obtener el porcentaje de células activadas en cada población (células CD69<sup>+</sup> dentro de cada población).



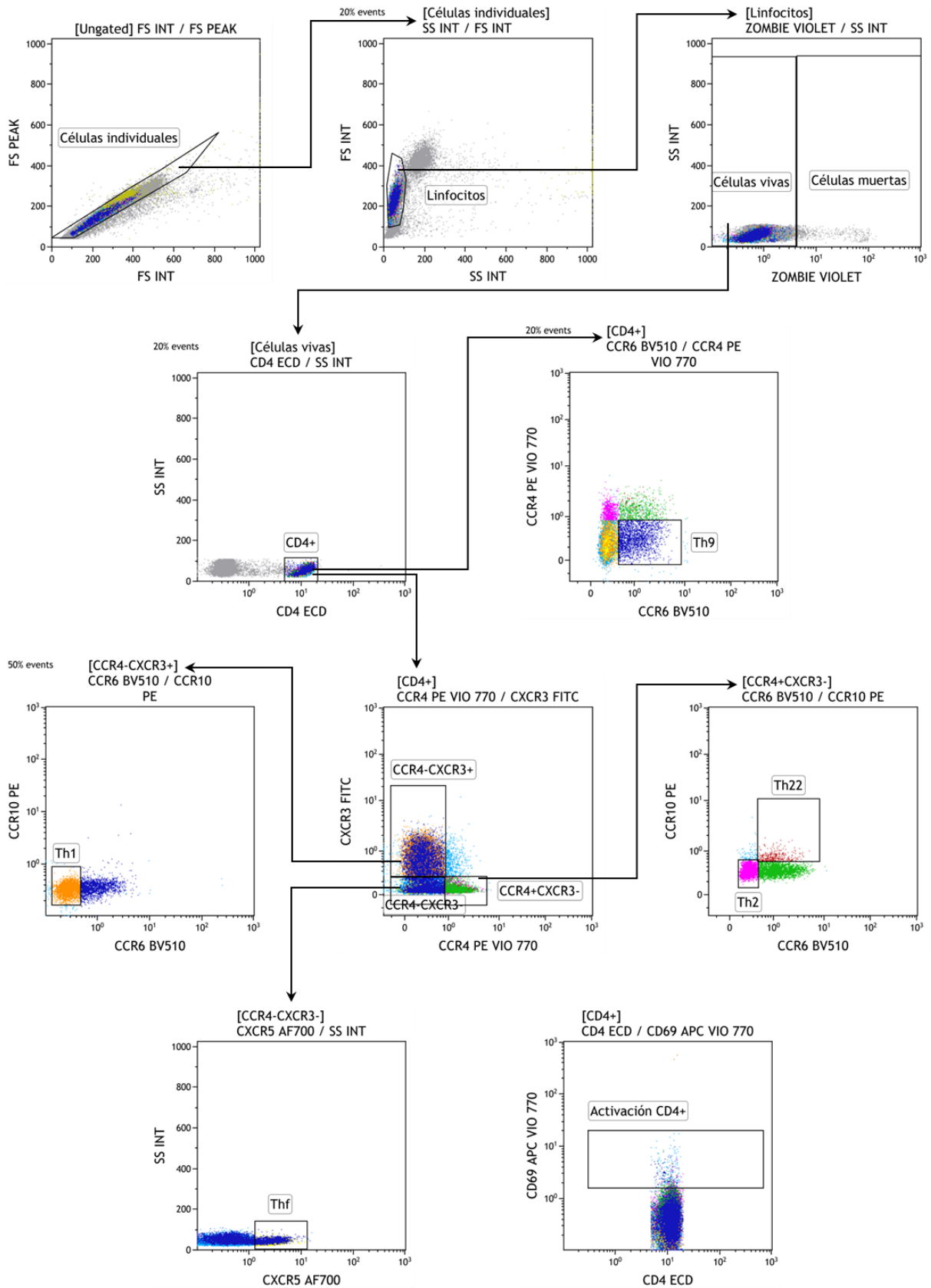


Figura 22. Ejemplo de los pasos seguidos en el análisis de linfocitos Th1, Th2, Th9, Thf y Th22 y la activación de las distintas poblaciones mediante el software *Kaluza* (Beckman Coulter).

### 6.2.2. Linfocitos Th17 y Tregs

Para este estudio se utilizaron dos tipos de inmunodetección: de marcadores presentes en la superficie celular, como en el apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos, y de marcadores intracelulares, moléculas presentes en el interior de la célula. Para esta última técnica es necesario permeabilizar la membrana celular, es decir, crear poros para permitir la entrada de los anticuerpos al interior de la célula, para lo cual se utilizó el kit *Human FoxP3 Buffer Set* (BD Pharmingen; Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos).

Una vez aislada la muestra, 1.500.000 PBMC se lavan con PBS, se centrifugan durante 5 minutos a 1.000 g y se resuspenden en 100 µL de PBS. La tinción con *Zombie Violet™ Fixable Viability Kit* y con los anticuerpos de superficie se realizó como se describe en el apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos. Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7. Combinación de anticuerpos de superficie utilizados en el estudio de subpoblaciones de linfocitos Th17 y Tregs en PBMC.** Se muestra la concentración de uso, el fluorocromo asociado y la casa comercial de cada anticuerpo.

Anticuerpo	Concentración	Fluoróforo	Casa comercial
CD4	1:25	ECD	Beckman Coulter
CD25	1:40	Brilliant Violet 510	Biolegend
CD69	1:50	APC Vio770	Miltenyi Biotec

ECD: Electron Coupled Dye; APC: Allophycocyanin.

Tras la lisis de eritrocitos se lavan las células con 2 mL de *Stain Buffer (Human FoxP3 Buffer Set; BD Pharmingen)* y se centrifugan 10 minutos a 250 g. Se elimina el *Stain Buffer* y se añade 2 mL de 1x *Human FoxP3 Buffer A (Human FoxP3 Buffer Set; BD Pharmingen)* para fijar las células; se incuba la muestra 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se centrifuga a 500 g durante 5 minutos, se elimina el fijador y se lavan las células con 2 mL de *Stain Buffer*. Se centrifuga a 500 g durante 5 minutos, se elimina el *Stain Buffer* y se añade 500 µL de 1X *Working Solution Human FoxP3 Buffer C (Human FoxP3 Buffer Set; BD Pharmingen)* para permeabilizar las células y se incuban durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Se lavan las células con 2 mL de *Stain Buffer*, se centrifugan a 500 g durante 5 minutos, se resuspenden las células con 100 µL de *Stain Buffer* que queda del lavado anterior y se incuban durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos para marcadores intracelulares. Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8. Combinación de anticuerpos intracelulares utilizados en el estudio de subpoblaciones de linfocitos Th17 y Tregs en PBMC.** Se muestra la concentración de uso, el fluorocromo asociado y la casa comercial de cada anticuerpo.

Anticuerpo	Concentración	Fluorocromo	Casa comercial
IL17	1:20	PE	Biolegend
FOXP3	1:5	Alexa Fluor 480	BD Pharmingen

PE: PhycoErythrin

Se repite el último lavado y se resuspenden las células con 100  $\mu$ L de volumen de *Stain Buffer* que queda del lavado anterior. Para obtener el dato del recuento celular se utiliza *Flow Count* (Beckman Coulter): se añaden 100  $\mu$ L de este reactivo a la suspensión y se pasa por el citómetro.

En la figura 21 se presenta un ejemplo de los pasos en el análisis de linfocitos Th17 y Tregs mediante el software *Kaluza* (Beckman Coulter). Para el análisis se seleccionan las células que han pasado por el citómetro de forma individual (“Células individuales”) y se establece la población de linfocitos por morfología, dentro de los cuales se determinan los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como células positivas para el marcador CD4. A partir de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se identifican varias poblaciones de interés por combinaciones de los marcadores utilizados (Figura 23):

- Linfocitos Th17: células IL17<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>).
- Linfocitos Tregs: células CD25<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>).

Una vez identificadas las poblaciones, cada una se enfrentó al marcador de activación temprana CD69, para obtener el porcentaje de células activadas en cada población (células CD69<sup>+</sup> dentro de cada población).

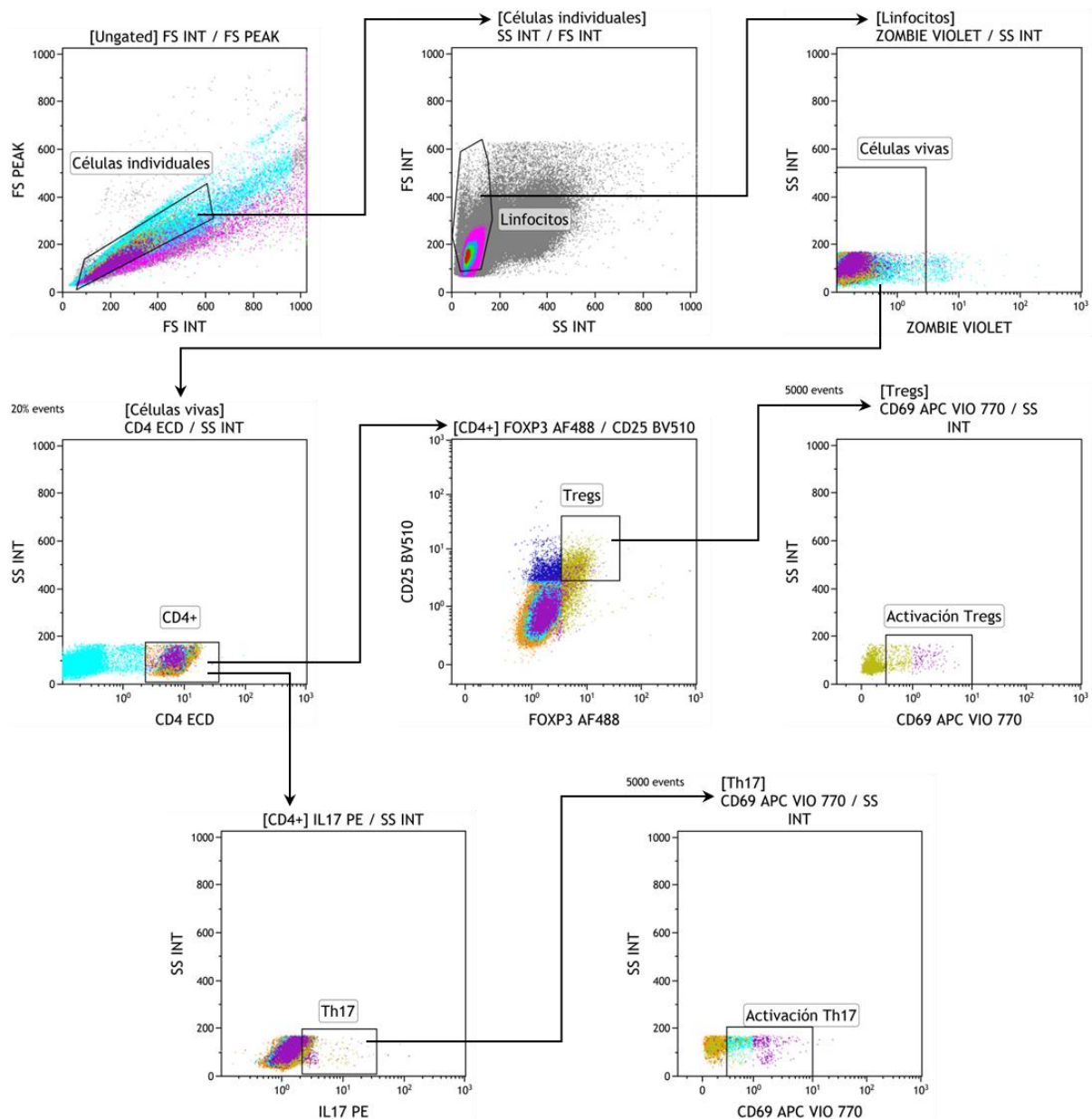


Figura 23. Ejemplo de los pasos seguidos en el análisis de linfocitos Th17 y Tregs y la activación de las distintas poblaciones mediante el software *Kaluza* (Beckman Coulter).

## 7. Medida de citocinas mediante *ELISA*

Las citocinas se midieron mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*ELISA*, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Con este fin se utilizaron kits comerciales *DuoSet® ELISA Kits* (R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos) para medir las citocinas: IL-17, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  y CCL20 (Tabla 9). Previamente a iniciar el protocolo se tapiza una placa de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal frente a la citocina de interés (anticuerpo de captura); para ello se diluye dicho anticuerpo en PBS, se añade a cada pocillo y se incuba durante toda la noche a 4 °C.

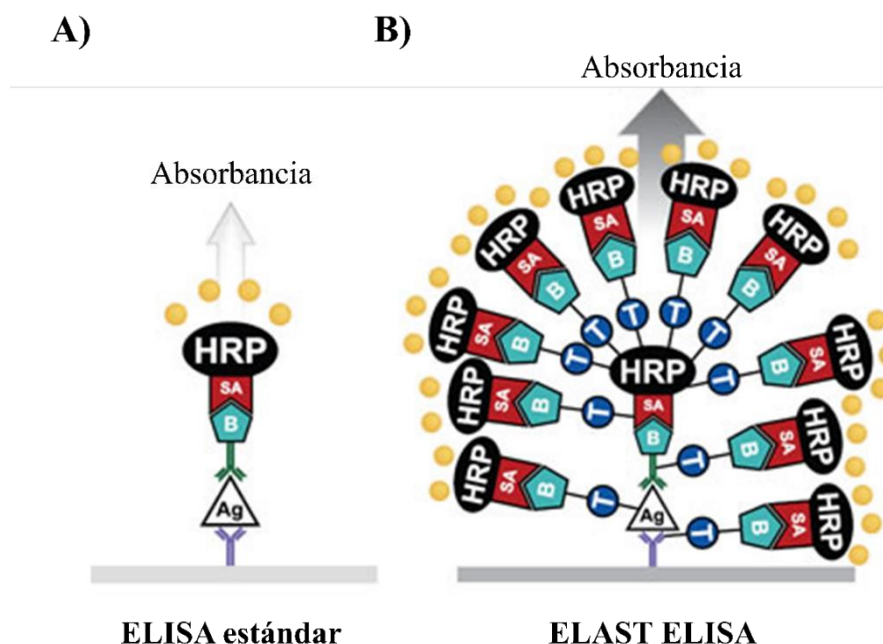
El primer paso es bloquear la superficie de los pocillos para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos; para ello se incuba con una solución enriquecida en albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Durante esta hora se prepara una curva de concentraciones conocidas de la citocina y las diluciones apropiadas de las muestras.

En el caso del kit para medir los niveles de TGF- $\beta$  se añade un paso previo de preparación de la muestra. Este paso consiste en tratar la muestra con un ácido para hacer accesibles los sitios de unión al anticuerpo de captura y una base que neutralice al ácido anterior para poder continuar con el protocolo. El ácido y la base utilizados fueron HCl 1N e NaOH 1.2N, respectivamente.

Se lava la placa para eliminar la solución de bloqueo, se añaden las muestras y los diferentes puntos de la curva y se incuba durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente. Durante esta incubación las moléculas de interés presentes en las muestras o en la curva se unen al anticuerpo de captura pegado a la placa. Tras esta incubación se lava la placa varias veces con tampón de lavado para eliminar las moléculas que no se hayan unido a los anticuerpos y se añade otro anticuerpo que se unirá al complejo anticuerpo de captura-citocina (el anticuerpo de detección). Se incuba durante 2 horas con el anticuerpo de detección en agitación a temperatura ambiente para que este se una al complejo anticuerpo-citocina.

Se lava la placa 3 veces con tampón de lavado y se añade estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano, que se une al complejo anticuerpo de captura-citocina-anticuerpo de detección (Figura 24A). Si la molécula de interés está poco concentrada, se puede añadir un paso que permite unir más moléculas de peroxidasa al complejo anticuerpo de captura-citocina-anticuerpo de detección, lo que denominamos el paso de amplificación de señal.

Este paso de amplificación se realiza con el kit *ELAST® ELISA Amplification System* (Perkin Elmer; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Una vez lavada la placa tras la incubación con la estreptavidina se añade una solución de biotil-tiamida del kit *ELAST®*, molécula que se une al complejo anticuerpo de captura-citocina-anticuerpo de detección. Se lava la placa 3 veces y se añade más estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano que se une a la biotil-tiamida anterior. Con este paso conseguimos tener un árbol ramificado de moléculas de peroxidasa, varias por cada citocina de interés unida (Figura 24B).



**Figura 24.** Esquema representativo del complejo anticuerpo de captura-citocina-anticuerpo de detección-estreptavidina en A) un ensayo ELISA convencional y B) un ELAST ELISA mediante la utilización del kit *ELAST® ELISA Amplification System*.

Para la medida de todas las citocinas, tras la incubación y lavado de la estreptavidina se añade a cada pocillo la solución del sustrato, una mezcla de  $H_2O_2$  y tetrametilbencidina. La oxidación de la tetrametilbencidina por parte de la peroxidasa produce un compuesto de color azul, la intensidad del cual es proporcional a la concentración de la citocina presente en los pocillos. Para parar la reacción de oxidación se añade ácido sulfúrico 2 N, virando el color del pocillo de azul a amarillo. Se lee la absorbancia de las muestras a 450 nm en un lector de placas. Las concentraciones de la citocina de cada muestra se interpolan a partir de los valores de absorbancia de la curva de concentraciones de citocina conocida, expresada en pg/mL.

Otras citocinas como el factor activador de linfocitos B perteneciente a la familia de TNF (BAFF, del inglés *B-cell Activating Factor belonging to the TNF Family*), ligando inductor de la proliferación (APRIL, del inglés *A Proliferation-Inducing Ligand*) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), así como los niveles de IgA, se midieron mediante kits ELISA comerciales *DuoSet® ELISA Kits* (R&D Systems) o *Uncoated ELISA Kit* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) en el caso de la IgA (Tabla 9). Estos kits siguen protocolos muy similares, solo con pequeños cambios en la composición de algunos reactivos.

Tabla 9. Kits ELISA comerciales.

Molécula	Dilución de la muestra	ELAST®	Kit, casa comercial y referencia
IL-17	Sin diluir	Si	Human IL-17 DuoSet ELISA. R&D Systems. DY317-05.
IL-21	Sin diluir	Si	Human IL-21 DuoSet ELISA. R&D Systems. DY8879-05.
IL-22	1:5	No	Human IL-22 DuoSet ELISA. R&D Systems. DY782-05.
TNF- $\alpha$	1:20	No	Human TNF-alpha DuoSet ELISA. R&D Systems. DY210-05.
TGF- $\beta$	1:5	No	Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA. R&D Systems. DY240-05.
IL-1 $\beta$	Sin diluir	Si	Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA. R&D Systems. DY201-05.
CCL20	1:3	No	Human CCL20/MIP-3 alpha DuoSet ELISA. R&D Systems. DY360-05.
BAFF	1:5	No	Human BAFF/BLyS/TNFSF13B DuoSet ELISA. R&D Systems. DY124-05.
APRIL	Sin diluir	No	Human APRIL/TNFSF13 DuoSet ELISA. R&D Systems. DY884B.
BDNF	1:5	No	Human/Mouse BDNF DuoSet ELISA. R&D Systems. DY248.
IgA	1:50.000	No	IgA Human Uncoated ELISA Kit. Thermo Fisher Scientific. 88-50600-88.

## 8. Medida de IL-17 en plasma mediante Simoa®

La determinación de la citocina IL-17 se realizó con la tecnología ultrasensible de matriz de molécula única (Simoa, del inglés *Single Molecule Arrays*) (Quanterix; Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). Esta metodología tiene una mayor sensibilidad y permite cuantificar moléculas cuyas concentraciones son muy bajas para ser detectadas mediante un ensayo ELISA, ya que permite medir molécula a molécula.

Para la medida de IL-17 se utilizó el equipo SIMOA HD-X *Analyzer*<sup>TM</sup> (Quanterix) y el kit *Simoa® IL-17A Advantage Kit* (ref. 101599) (Quanterix) siguiendo las indicaciones del fabricante.

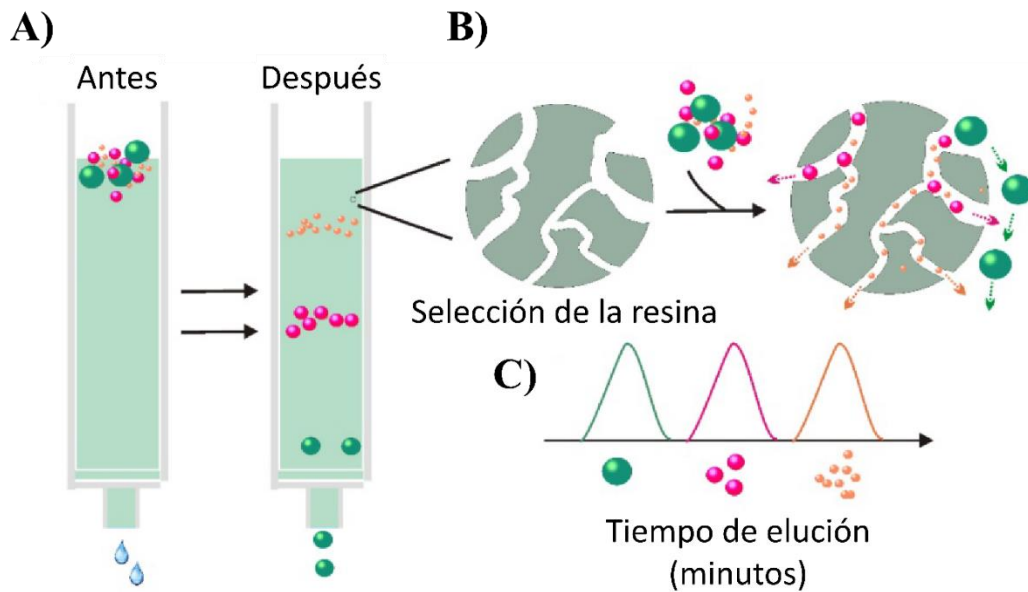
La base de la metodología es similar a la utilizada en un ensayo ELISA (ver apartado 7 de Materiales y Métodos). En esta metodología se emplean esferas magnéticas que llevan un anticuerpo de captura, que une una sola molécula de interés. Al conjunto anterior se une el anticuerpo de detección biotinilado, que contiene la enzima estreptavidina- $\beta$ -galactosidasa, que transformará el sustrato resorufina  $\beta$ -D-galactopiranosido en un producto fluorescente. Una vez

realizados los pasos anteriores, la solución se deposita en una matriz con micropocillos, dentro de los cuales se situará una única esfera magnética gracias a la fuerza magnética y gravitacional; posteriormente se elimina el exceso de solución de la matriz y se sella al añadir un aceite de fluorocarbono. Una vez sellada la matriz se estimula a diferentes longitudes de onda para obtener la señal que se utilizará para calcular las concentraciones de la molécula de interés. El equipo SIMOA HD-X *Analyzer*<sup>TM</sup> (Quanterix) está totalmente automatizado y realiza los pasos, lavados, incubaciones y cálculos del experimento sin necesidad de intervención, mejorando la reproducibilidad de los resultados.

## **9. Aislamiento de vesículas extracelulares a partir de plasma por cromatografía de exclusión por tamaño**

El aislamiento de VE se realizó a partir del plasma resultante de la centrifugación en gradiente de densidades con Lymphoprep<sup>TM</sup> (Palex Medical SA) (ver apartado 5 de Materiales y Métodos). Este aislamiento se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 25A) en columnas qEV (IZON Science; Christchurch, Nueva Zelanda). Estas columnas contienen una resina con poros de aproximadamente 70 nm, por donde pasarán proteínas y otras moléculas de pequeño tamaño, eluyendo en fracciones más tardías. Las VE viajan por fuera de la resina y eluyen en fracciones tempranas, permitiéndonos separarlas de otros componentes presentes en el plasma (Figura 25B y 25C). En la Figura 26 se muestra un esquema experimental de la separación de VE a partir de plasma mediante cromatografía de exclusión por tamaño.





**Figura 25. Cromatografía de exclusión por tamaño** (modificado de Yang *et al. Theranostics*, 10, 3684–3707, 2020)<sup>401</sup>.

### 9.1. Separación de vesículas extracelulares a partir de plasma

Para el aislamiento de las VE se partió de 5 mL del plasma resultante del gradiente de densidades del aislamiento de PBMC. Este plasma se centrifugó 20 minutos a 2.000g para eliminar restos celulares y se concentró utilizando tubos Amicon® Ultra-4 (Merck; Darmstadt, Alemania), que dejan pasar el agua y retienen el resto de componentes del plasma, concentrando la muestra. Tras cargar el tubo Amicon® Ultra-4 (Merck) con el plasma, se centrifugó durante 40 minutos a 4.600 g en un rotor basculante hasta concentrar la muestra a 1 mL.

Se cargó el mililitro de muestra en una columna qEV y una vez pasó todo el volumen inicial de plasma se fue añadiendo PBS para que siguiera eluyendo la muestra hasta recoger 15 fracciones de 500  $\mu$ L cada una. Las VE se encuentran de las fracciones 6 a la 10 y posteriormente eluyen las proteínas plasmáticas.

A modo de comprobación de que el aislamiento fue correcto se midió la concentración de proteína de cada fracción siguiendo el método BCA (*BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific). Este método consiste en la mezcla de dos reactivos: reactivo A y B, mezclados en proporción 50:1 respectivamente. El reactivo A contiene carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en NaOH 0,1 M; el reactivo B contiene sulfato cúprico 4%. Un volumen de 200  $\mu$ L de esta mezcla se añade a 20  $\mu$ L de muestra y se incuba

durante 30 minutos a 37 °C. Esta mezcla da lugar a una reacción colorimétrica proporcional a la cantidad de proteína en la muestra, cuya absorbancia a 570 nm se mide en un espectrofotómetro (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific). Para conocer la concentración de proteína en cada fracción, estos valores de absorbancia se interpolan a partir de los valores de absorbancia de una curva patrón de concentraciones conocidas de BSA, expresados en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

El patrón de proteína esperado en un aislamiento correcto debe de ir en aumento a medida que avanzan las fracciones, es decir, desde una concentración de proteína indetectable en las primeras fracciones hasta una concentración elevada en las últimas. En las primeras fracciones no se debe detectar proteína, ya que eluye solo el PBS presente en la columna antes de añadir la muestra; a medida que eluyen las VE aumenta la concentración de proteína en las fracciones, hasta llegar a concentraciones altas de proteínas en las últimas fracciones, que corresponderían a las proteínas plasmáticas.

Una vez comprobado el buen aislamiento, se homogenizaron las fracciones enriquecidas en VE (fracciones de la 6 a la 10) y se concentraron utilizando tubos Amicon® Ultra-4 hasta obtener un volumen final de aproximadamente 200  $\mu\text{L}$ . Se cuantificó la concentración de proteína en la muestra resultante y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de su uso.

Estas muestras se utilizaron para el estudio del contenido proteico en VE (ver apartado 9 de Materiales y Métodos) y en estudios funcionales sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup> (ver apartado 13 de Materiales y Métodos).

## **9.2. Análisis de rastreo de nanopartículas**

La distribución de tamaños y concentración de las VE en las muestras fueron medidas mediante el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, del inglés *Nanoparticle Tracking Analysis*) en el instrumento NanoSight NS300 (Malvern Panalytical; Malvern, Reino Unido). Para su medida la muestra se diluyó 1:1000 en PBS. Esta tecnología se basa en hacer pasar un haz de luz por la muestra que al incidir en las partículas se refracta y es captada por el sistema, el cual utiliza esta refracción para determinar el tamaño y concentración de las partículas. El tamaño de estas vesículas oscila entre 40 y 160 nm.

### 9.3. Microscopía electrónica de transmisión

Como método de comprobación de la presencia de VE en las muestras aisladas se realizó microscopía electrónica de transmisión en muestras aleatorias de los tres grupos de estudio. Para ello, se fijaron 5  $\mu$ L del concentrado de VE con paraformaldehído al 2% y se cargaron sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono. Se realizó el contraste con acetato de uranilo al 1% y se examinaron las muestras con el microscopio electrónico de transmisión, captando las imágenes usando una cámara digital.

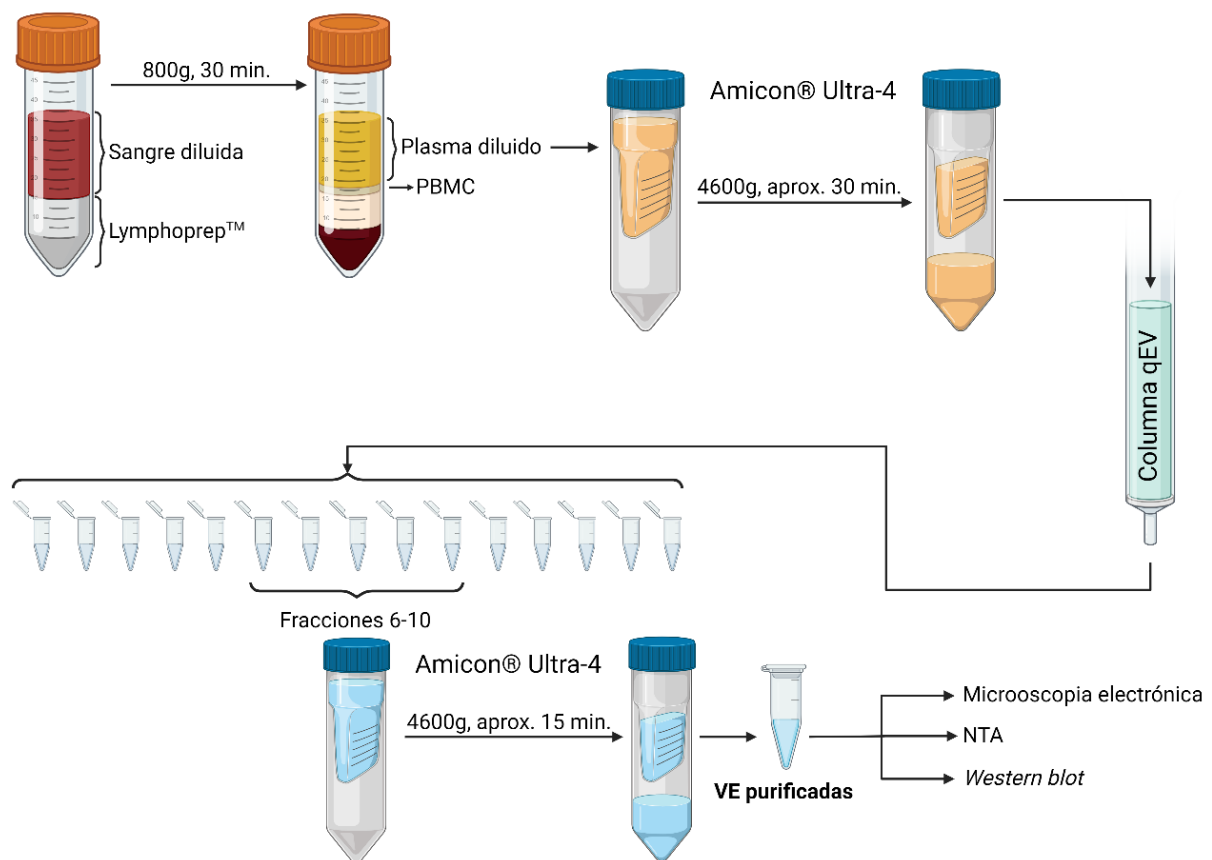


Figura 26. Esquema experimental de la separación de VE a partir de plasma mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

## 10. Estudio del contenido proteico en vesículas extracelulares mediante *western blot*

Esta metodología consiste en separar las proteínas por tamaño en un gel de poliacrilamida, transferir las bandas de proteína a una membrana e incubarla con anticuerpos que nos permitan visualizarlas y cuantificarlas. La intensidad de estas bandas es proporcional al nivel de expresión, y se relativiza a la media de la expresión del grupo control utilizado.

## *Materiales y métodos*

Los geles para separar las proteínas constan de dos zonas: el *separating* (Tabla 10), zona en la cual se separan las proteínas en base a su tamaño (kDa), y el *stacking* (Tabla 10), que concentra las muestras antes de que entren en la zona *separating*. El porcentaje de acrilamida del gel *separating* varía en función del tamaño de las proteínas a analizar. En nuestro caso se utilizaron geles del 8 al 12% de acrilamida.

Se cargó en cada carril del gel la misma cantidad de proteína de cada muestra homogeneizada en tampón de carga 2X (Tabla 10), además del marcador de peso molecular *Full-range Amersham Rainbow Marker* (GE Healthcare Life Sciences; Fairfield, Connecticut, Estados Unidos) en el primer carril, el cual nos permite identificar en qué zona se encuentran las proteínas de interés. Previamente a ser cargadas las muestras diluidas en tampón de carga se hirvieron durante 5 minutos a 95 °C. Las proteínas se separan en el gel por electroforesis al aplicar sobre él una corriente eléctrica. La intensidad de la corriente aplicada fue de 25 mA por gel.

Tras la electroforesis se transfieren las proteínas del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) utilizando un tampón de transferencia (Tabla 10) y aplicando una corriente de 400 mA. Las membranas con las proteínas transferidas se bloquean con BSA al 5% en tampón salino TBS-Tween durante 1 hora con el fin de impedir uniones inespecíficas de los anticuerpos. Una vez bloqueada se lavan tres veces con TBS-Tween.

Las membranas se cortan separando diferentes proteínas en diferentes secciones de las membranas según su tamaño. Cada sección se incuba con anticuerpos primarios diferentes dependiendo de la proteína a detectar. Los anticuerpos se diluyen en solución de bloqueo y se incuban con las secciones de membrana toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios y diluciones utilizadas se muestran en la Tabla 11.

Tras la incubación se lavan las membranas y se incuban con el anticuerpo secundario durante 1 hora. Se lavan tres veces las membranas con TBS-Tween (Tabla 10) y un último lavado con tampón sustrato (Tabla 10). Las membranas se revelan sumergiéndolas en solución de revelado (Tabla 10). Esta solución reacciona con la fosfatasa alcalina del anticuerpo secundario, creando un precipitado de color morado donde se encuentra la proteína de interés, siendo proporcional la intensidad del color de la banda a la cantidad de proteína presente en ella. El tiempo de revelado varía en cuanto a la proteína analizada y se detiene la reacción de revelado sumergiendo las membranas en agua destilada.

En el caso de la proteína Alix se revelaron las membranas mediante quimioluminiscencia mejorada con el kit Sustrato de máxima sensibilidad *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific).

En los geles se cargó el volumen correspondiente a 10 µg de las VE aisladas en el apartado 9 de Materiales y Métodos.

Para cuantificar las bandas se escanearon las membranas y la intensidad de las bandas se cuantificó con el programa AlphaImager 2200 (AlphaEaseFC 2200 para Windows; Cambridge, Reino Unido). La cantidad de proteína en cada muestra se calculó como incremento en el contenido en porcentaje con respecto a la media del grupo control.

**Tabla 10. Composición de las diferentes soluciones utilizadas en la separación y cuantificación de proteínas mediante *western blot*.**

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
Gel <i>stacking</i>	Tris base 0,125 M y 0,1 % SDS a pH 6,8, acrilamida 3,9 %, bisacrilamida 0,015 %, APS 0,5 % y TEMED 0,1%.
Gel <i>separating</i>	Tris base 0,4 M y 0,1 % SDS a pH 8,8, acrilamida al 8-12 %, bisacrilamida al 0,2-0,3 %, APS 1 % y TEMED 0,18 %.
Tampón de carga 2X	Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8, glicerol 5 %, SDS 10 %, 2-mercaptoetanol 2,5 % y azul de bromofenol 1 %.
Tampón de electroforesis	Tris base 25 mM, SDS 3,5 mM y glicina 0,2 M.
Tampón de transferencia	Tris base 25 mM, glicina 0,19 M y 20 % de metanol.
TBS-Tween	NaCl 150mM, tris base 50 mM y 0,1 % Tween-20 a pH 7,5.
Tampón sustrato	NaCl 100 mM, MgCl <sub>2</sub> 5 mM y tris base 100 mM a pH 9,5.
Solución de revelado	0,66 % de NBT (cloruro de nitroblue tetrazolium) y 0,34% de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en tampón sustrato.

**Tabla 11. Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas.**

Proteína	Anticuerpo primario		
	Especie	Dilución	Casa comercial
CD9	Conejo (rb)	1:500	Sigma-Aldrich
Alix <sup>a</sup>	Conejo (rb)	1:1000	Proteintech
Calnexina	Conejo (rb)	1:1000	Novus Biological
$\beta$ -actina	Ratón (ms)	1:5000	Abcam
GAPDH	Ratón (ms)	1:15000	Sigma-Aldrich
Flotillin-2	Conejo (rb)	1:500	Invitrogen
TNF- $\alpha$	Conejo (rb)	1:500	Abcam
TNFR1	Conejo (rb)	1:1000	Abcam
ADAM17	Conejo (rb)	1:250	Abcam
Glutamina sintetasa	Ratón (ms)	1:5000	Thermo Fisher Scientific
Glutaminasa	Conejo (rb)	1:1000	Novus Biological
MHC I	Conejo (rb)	1:1000	Invitrogen
MHC II	Conejo (rb)	1:1000	Invitrogen
CD74	Ratón (ms)	1:1000	Abcam
L1CAM	Conejo (rb)	1:1000	Bioss
CD13	Conejo (rb)	1:500	Bioss
CD3	Rata (rat)	1:500	Abcam
CD4	Conejo (rb)	1:1000	Novus Biological
CD8	Conejo (rb)	1:2000	Thermo Fisher Scientific
CD19	Conejo (rb)	1:1000	Abcam
CD14	Conejo (rb)	1:1000	Abcam
CD16	Conejo (rb)	1:100	Santa Cruz
CD86	Ratón (ms)	1:200	Abcam

Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) y la dilución en todos los casos fue de 1:4000. <sup>a</sup>Para la proteína Alix, se utilizó un anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:4000.

## 11. Estudio del contenido de TGF- $\beta$ en vesículas extracelulares mediante *ELISA*

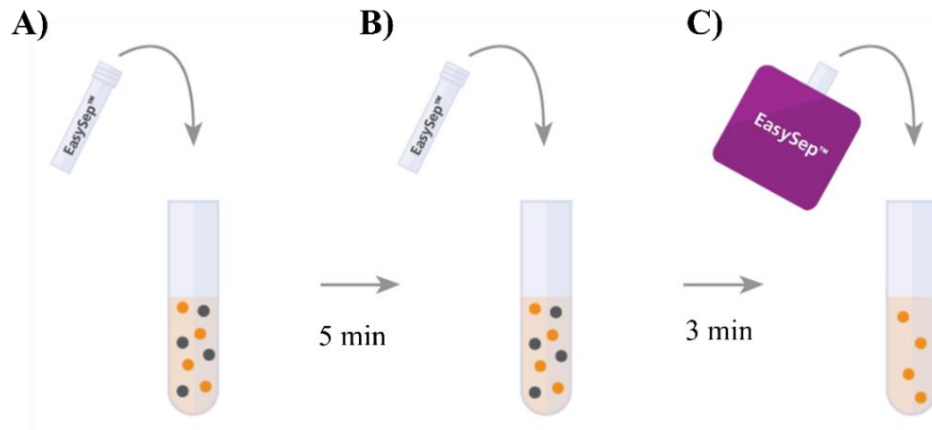
Para la determinación del contenido de TGF- $\beta$  en VE se utilizó la técnica ELISA como se describe en el apartado 7 de Materiales y Métodos, utilizando el *Human TGF- $\beta$  1 DuoSet ELISA kit* (DY240-05). La cantidad de muestra de VE tratada con el ácido y la base y utilizada para la cuantificación del TGF- $\beta$  fue el volumen equivalente a 20  $\mu$ g de proteína total. El contenido de TGF- $\beta$  en cada muestra se calculó como incremento en el contenido en porcentaje con respecto a la media del grupo control.

## 12. Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> a partir de PBMC congeladas

Para obtener la muestra de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se partió de PBMC congeladas en nitrógeno líquido. La descongelación debe ser rápida para limitar el contacto de las células con el DMSO, maximizando así la viabilidad. El aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se realizó con el kit comercial *EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit* (StemCell Technologies; Vancouver, Canadá) de selección negativa. Este kit se basa en una mezcla de anticuerpos diseñada para que se unan a todas las células presentes en el conjunto de PBMC a excepción de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En los siguientes pasos se añaden esferas magnéticas que se unirán a estos anticuerpos y tras incubar esta suspensión en un vial, por efecto de un imán, se quedan retenidas en la pared del vial todas las células que no sean linfocitos T CD4<sup>+</sup>, dejando estos últimos libres para ser transferidos a otro vial (Figura 27).

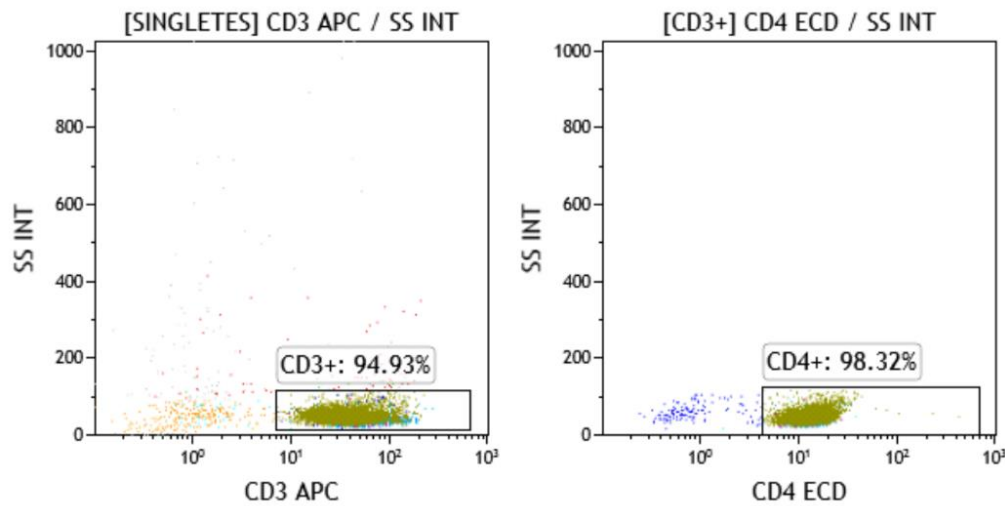
La descongelación se llevó a cabo en un baño a 37 °C y se lavaron las células para eliminar el DMSO con abundante medio RPMI pre-calentado (Biowest). Se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 500 g y se resuspendió en *EasySep™ Buffer* (StemCell Technologies) para iniciar el aislamiento mediante *EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit*. Se transfiere esta suspensión a un tubo de poliestireno y se incuba con la mezcla de anticuerpos (50 µL por mL de muestra) (Figura 27A) durante 5 minutos, se añaden las esferas magnéticas (50 µL por mL de muestra) (Figura 27B), se lleva el volumen a 2,5 mL con *EasySep™ Buffer* y se incuba durante 3 minutos dentro de un imán *EasySep™ Magnet* (StemCell Technologies). Pasados estos 3 minutos los T CD4<sup>+</sup> quedan en suspensión y el resto de células pegadas a la pared del tubo. Se transfiere la suspensión a un nuevo tubo por inversión sin retirar el tubo original del imán (Figura 27C).

Las células resultantes ya están listas para estudios funcionales (ver apartado 13 de Materiales y Métodos) o se almacenaron a 80 °C bajo cero para el análisis de proteínas mediante *western blot* (ver apartado 14.1 de Materiales y Métodos) o expresión génica mediante PCR cuantitativa (ver apartado 14.2 de Materiales y Métodos).



**Figura 27.** Esquema del aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante el kit comercial *EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit* (StemCell Technologies) de selección negativa.

Tras el proceso de aislamiento se comprobó la pureza de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la muestra por citometría de flujo. Con este fin se incubaron las células con los anticuerpos anti-CD3 (APC, Biolegend) y anti-CD4 (ECD, Beckman Coulter) utilizando la misma metodología, citómetro y software de análisis que el apartado 6.2.1 de Materiales y Métodos. Se consideraron linfocitos T CD4<sup>+</sup> a las células doble positivas para estos marcadores, obteniendo un porcentaje de pureza del 98% dentro de las células totales en la muestra (Figura 28).



**Figura 28.** Comprobación de la pureza de la muestra de linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante citometría de flujo.



### **13. Estudio del efecto de la adición de vesículas extracelulares a cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

Una vez aislados los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (ver apartado 12 de Materiales y Métodos) se resuspenden en medio *X-VIVO*<sup>TM</sup> 20 *Serum-Free* (Lonza; Basilea, Suiza) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) a una concentración de 1 millón de células por mililitro. A esta suspensión se le añade el anticuerpo anti-CD28 (BD Pharmingen) a una concentración de 1 µg/mL para activar las células.

Las células se siembran en placas de 48 pocillos tapizados previamente con el anticuerpo anti-CD3 (BD Pharmingen) (120 µL de anti-CD3 a 1 µg/mL en PBS por pocillo durante toda la noche). Se siembran 500.000 células y se incuban hasta 5 días a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

Estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> se cultivan independientemente junto a VE aisladas de los tres tipos de sujetos de estudio (Control, Sin EHM y EHM) con un volumen correspondiente a 10 µg de proteína de vesículas. Se establece una condición de células cultivadas sin VE como condición de referencia (Figura 29).

A las 24 horas se recogieron 100 µl de medio y se siguió incubando el cultivo. A los 5 días se recogió todo el pocillo previamente homogeneizado para despegar las células y se centrifugó 5 minutos a 1.800 g para obtener el sedimento celular. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Las muestras se congelaron a 80 °C bajo cero hasta su uso. El medio se utilizó para medir citocinas y el sedimento celular para el estudio de expresión de factores de transcripción específicos para distintas poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 29).

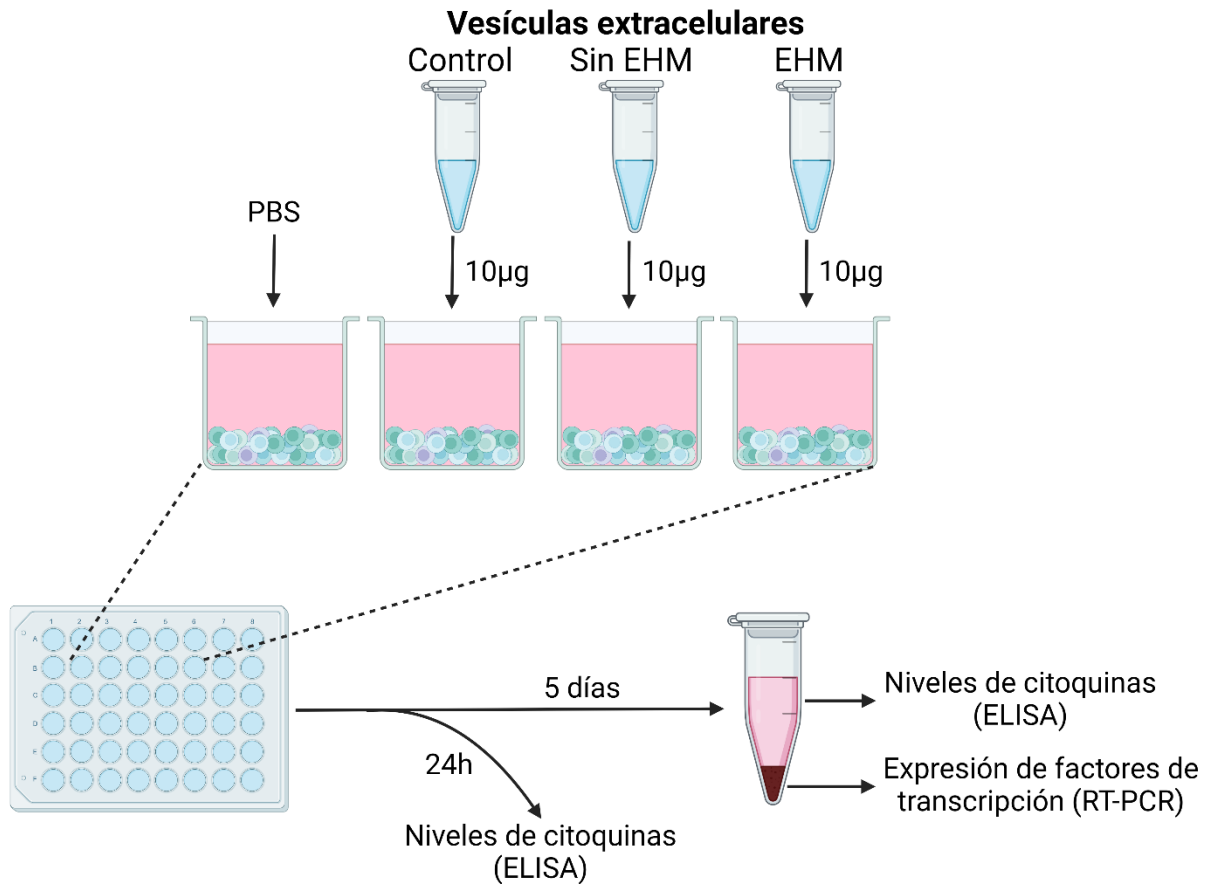


Figura 29. Esquema experimental del estudio del efecto de la adición de VE sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

### 13.1. Determinación de los niveles de citocinas en medio de cultivo

Las citocinas presentes en las muestras de medio de cultivo se midieron utilizando kits comerciales *DuoSet® ELISA Kits* (R&D Systems) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7 de Materiales y Métodos. Las citocinas medidas fueron IL-17, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  y CCL20.

Las concentraciones de la citocina en cada muestra se interpolaron a partir de los valores de absorbancia de la curva de concentraciones de citocina conocida, expresada en pg/mL. El nivel de citocina en el medio para cada muestra se calculó como incremento en porcentaje con respecto al nivel en el medio de la condición de referencia (o células cultivadas sin VE) para cada experimento independiente.

## 13.2. Medida de la expresión de factores de transcripción

### 13.2.1. Aislamiento del ARN total

El aislamiento de ARN se realizó a partir del sedimento celular obtenido a los 5 días del cultivo con el reactivo *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich). Este reactivo contiene una mezcla de tiocianato de guanidino y fenol que lisa las células y permite crear diferentes fases para poder aislar ARN, ADN y proteína.

En el primer paso se homogeneiza la muestra con *TRI Reagent* y cloroformo-isoamil alcohol (Sigma-Aldrich) y se centrifugan las muestras durante 15 minutos a 13.000 g a 4 °C. Esta centrifugación genera tres fases, de arriba abajo: fase acuosa con el ARN disuelto, la interfase de ADN y la fase orgánica con las proteínas.

Se recoge la fase acuosa en un nuevo tubo y se precipita el ARN añadiendo isopropanol (Sigma-Aldrich). Se deja precipitar el ARN toda la noche a 20 °C bajo cero. Al día siguiente se centrifuga durante 15 minutos a 13.000 g a 4 °C, se elimina el sobrenadante y se lava el ARN precipitado con etanol al 75% frío. Se centrifuga durante 15 minutos a 13.000 g a 4 °C, se deja evaporar el etanol y se resuspende el ARN en agua libre de RNAsas.

La concentración y pureza del ARN se determinó mediante un espectofotómetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies; Wilmington, Delaware, Estados Unidos) con 2 µL de muestra. La pureza del ARN se comprueba con la ratio  $\lambda=260 \text{ nm}/\lambda=280 \text{ nm}$ . Un ARN es de buena calidad cuando su valor está comprendido entre 1,8 y 2 unidades.

### 13.2.2. Retrotranscripción

La reacción de retrotranscripción se realizó a partir de 1 µg de ARN utilizando el kit *Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Applied Biosystems; Foster City, California, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante. Con esta reacción se consigue transcribir de manera reversa las cadenas de ARN a ADN complementario por acción de la enzima retrotranscriptasa. La reacción se lleva a cabo en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems).

Las condiciones de la retrotranscripción utilizadas fueron: 10 minutos a 25 °C (activación de la enzima), 120 minutos a 37 °C (reacción de retrotranscripción), 5 minutos a 85 °C (inactivación de la enzima) y para finalizar se mantiene la muestra a 4 °C hasta ser almacenada.

### **13.2.3. PCR cuantitativa**

La PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica en la cual se amplifica el ADNc y cuantifica simultáneamente mediante una sonda conjugada a un fluoróforo. La fluorescencia de cada reacción es proporcional a la cantidad de ARNm de interés presente en la primera muestra de ARN.

Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos (Applied Biosystems) en un termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems). La expresión de cada gen de interés se relativizó a la expresión de un control endógeno de expresión constitutiva; en dichos experimentos se utilizó una sonda para el gen HPRT1 (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) como gen endógeno.

Los reactivos utilizados fueron *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) y sondas Taqman™ (Applied Biosystems), todas ellas conjugadas al fluoróforo FAM (Tabla 12).

Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 2 minutos a 50 °C iniciales, 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Los datos resultantes son valores de  $C_t$  (del inglés *Cycle threshold*), que nos indican en que ciclo se empieza a detectar la fluorescencia en cada reacción. Con estos datos se realizan una serie de cálculos para estandarizar el nivel de expresión de las muestras respecto a un grupo control, lo que se denomina *fold change*. Valores de *fold change* igual a 1 indican un nivel de expresión de la muestra igual a la del grupo control, mientras que valores menores o mayores a 1 indican menor o mayor expresión del gen de interés con respecto al del grupo control respectivamente.

Utilizamos sondas específicas para medir el nivel de expresión de varios factores de transcripción, asociados a subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos (Tabla 12).

**Tabla 12. Sondas Taqman™ (Applied Biosystems) del gen endógeno y los factores de transcripción característicos de subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

Gen de interés	Subtipo de linfocito T CD4 <sup>+</sup>	Referencia
HPRT1	Gen endógeno	Hs02800695_m1
TBX21	Th 1	Hs00203436_m1
GATA3	Th 2	Hs00231122_m1
FOXP3	Tregs	Hs01085834_m1
RORC	Th 17	Hs01076122_m1
AHR	Th 22	Hs00907314_m1
BCL6	Thf	Hs00153368_m1

## 14. Estudio de la expresión génica y el contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Las células T CD4<sup>+</sup> para este estudio fueron aisladas como se indica en el apartado 12 de Materiales y Métodos. De cada muestra se separaron dos alícuotas, para el análisis de expresión génica y proteica, que se almacenaron a 80 °C bajo cero hasta su uso.

### 14.1. Estudio del contenido proteico mediante *western blot* en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Para aislar la proteína contenida en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se utilizó el tampón de extracción y lisis RIPA (Thermo Fisher Scientific), al cual se le añade Minipastillas inhibidoras de proteasas y fostatasas Pierce™ sin EDTA (Thermo Fisher Scientific); con estos reactivos se consigue lisar las células para dejar las proteínas libres y conservarlas evitando su degradación.

Las células almacenadas a 80 °C bajo cero se resuspendieron con 1 mL de PBS frío y se centrifugaron 5 minutos a 2.500 g para lavarlas. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 50 µL del tampón RIPA más un inhibidor de proteasa. Para aumentar la eficiencia de la lisis se sonica la muestra con tres pulsos de 10 segundos al 30%, manteniéndola en hielo y dejándola enfriar entre pulsos. Para eliminar los restos celulares se centrifugaron las muestras 15 minutos a 14.000 g a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se cuantificó la concentración de proteína por el método BCA (Thermo Fisher Scientific) descrito en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos.

El estudio de expresión proteica se llevó a cabo mediante la técnica *western blot* (ver apartado 10 de Materiales y Métodos). En los geles se cargó el volumen correspondiente a 20 µg de proteína aislada de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Las proteínas analizadas y anticuerpos se indican en la tabla 13.

**Tabla 13. Proteínas analizadas y anticuerpos utilizados en el estudio de expresión proteica en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

Proteína	Anticuerpo primario		
	Especie	Dilución	Casa comercial
A20	Ratón (ms)	1:1000	Abcam
TTP	Conejo (rb)	1:1000	Abcam
TNF- $\alpha$	Conejo (rb)	1:500	Abcam
IL-1 $\beta$	Cabra (gt)	1:500	Novus Biological
Glutaminasa	Conejo (rb)	1:1000	Novus Biological

Todos los anticuerpos secundarios eran de la casa comercial Sigma-Aldrich conjugados a fosfatasa alcalina; la dilución utilizada en todos los casos fue de 1:4000.

## 14.2. Estudio de expresión génica mediante PCR cuantitativa en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

La metodología, reactivos y cálculos son idénticos a los descritos en el apartado 13.2 de Materiales y Métodos. Las sondas se indican en la tabla 14.

**Tabla 14. Sondas Taqman<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) utilizadas en el estudio de expresión génica en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

Gen de interés	Referencia
HPRT	Hs02800695_m1
TLR2	Hs01872448_s1
TLR4	Hs00152939_m1
CD86	Hs01567026_m1
CCR2	Hs00704702_s1
IL-1 $\beta$	Hs01555410_m1
TNF- $\alpha$	Hs00174128_m1
IL-17	Hs00174383_m1
IL-6	Hs00985639_m1

## 15. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software *GraphPad Prism* versión 7 (GraphPad Software; San Diego, California, Estados Unidos) y *SPSS Statistics v22* (SPSS, Inc; Chicago, Illinois, Estados Unidos).

Se realizó un análisis descriptivo para caracterizar la muestra. La distribución de las variables cuantitativas se obtuvo mediante el análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnow y Shapiro-Wilk y se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

En los casos en los que se comparaban tres grupos de datos independientes se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido del test de Tukey para comparar medias entre los grupos de

estudio, mientras que cuando se comparaban dos grupos de datos independientes se realizó una prueba T de Student.

En el caso de los experimentos del efecto *in vitro* de VE sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup> tenemos un grupo de referencia que no se incubó con VE. En este caso se realizó una prueba T de Student pareado para comparar el efecto de cada tipo de vesículas con respecto a la condición de referencia. Posteriormente se realizó un análisis ANOVA de una vía de muestras relacionadas seguido del test de Tukey para comparar medias por parejas dentro de las condiciones cultivadas con VE.

Para el estudio de correlaciones entre las alteraciones cognitivas y los diferentes parámetros bioquímicos e inmunológicos se llevó a cabo un análisis de correlación bivariada, utilizando el coeficiente de correlación de Spearman para las variables discretas y el coeficiente de correlación de Pearson para variables continuas. El coeficiente de correlación de Spearman se utilizó para correlacionar la puntuación PHES con los parámetros bioquímicos e inmunológicos, mientras que el coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para correlacionar las puntuaciones obtenidas de los test psicométricos con los parámetros bioquímicos e inmunológicos.

Se realizó un análisis de curvas ROC (del inglés, *Receiver Operating Characteristic*) y el área bajo la curva (AUC, del inglés *Area Under the Curve*) con el fin de estudiar la capacidad de las variables estudiadas en diagnosticar la EHM.

Se consideraron valores de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativos.





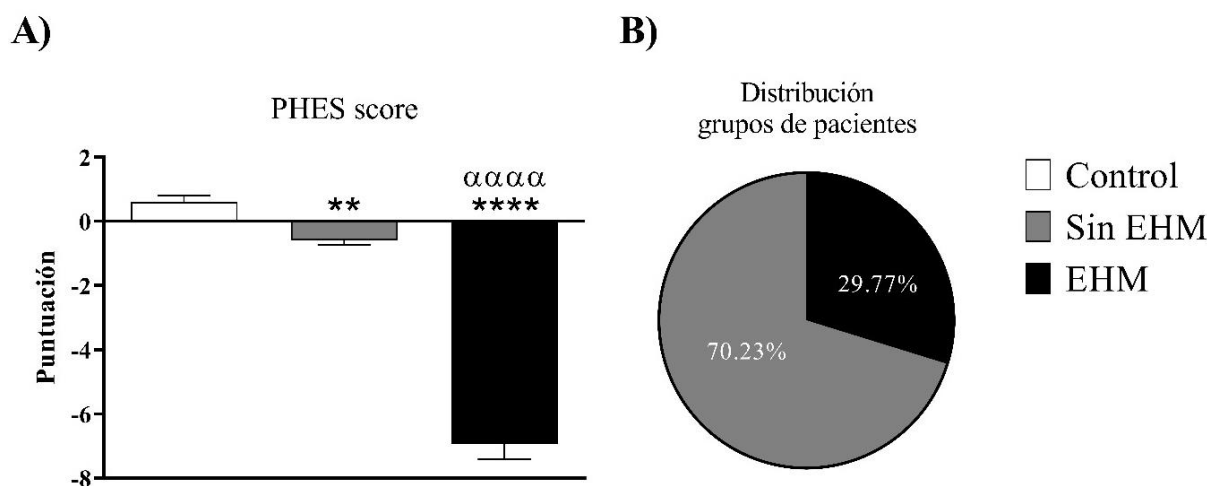
## **VI. RESULTADOS**



## 1. Clasificación y características de la cohorte de estudio

### 1.1. Diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima mediante la batería PHES

Todos los sujetos, tanto controles como pacientes, realizaron la batería de test psicométricos PHES; en el caso de los controles sanos se realizó la batería PHES para confirmar que no presentaban deterioro cognitivo leve medido por dicho test. En cuanto a los pacientes, el objetivo fue diagnosticar la EHM, clasificando a los pacientes como “Sin EHM”, cuando obtuvieron una puntuación mayor a -4, o como “EHM”, si su puntuación era igual o menor a -4. El 29,8% de los pacientes fue diagnosticado como pacientes con EHM (Figura 30 B) (Tabla 15). Dado que este test es el utilizado para clasificar a los pacientes es de esperar las diferencias observadas entre la puntuación del grupo EHM ( $-6,9 \pm 0,5$ ) respecto al grupo Control ( $0,6 \pm 0,2$ ;  $p < 0,0001$ ) y Sin EHM ( $-0,6 \pm 0,1$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 30A). Los pacientes Sin EHM también presentaron una puntuación significativamente menor con respecto al grupo Control ( $p < 0,01$ ) (Figura 30A), pero menos acusada que en los pacientes con EHM; esto reveló una ligera alteración cognitiva en una parte o totalidad del grupo, pero no suficientemente grave como para ser diagnosticada por el PHES.



**Figura 30. Puntuación obtenida en la batería PHES y distribución de los grupos de pacientes.** Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM para la puntuación PHES y en porcentaje para la distribución de los pacientes. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

## 1.2. Características de controles y pacientes

Se recogió la información relativa a edad, sexo, etiología de la cirrosis y valores de las escalas de daño hepático (Child Pugh y MELD) de los participantes en el estudio (Tabla 15).

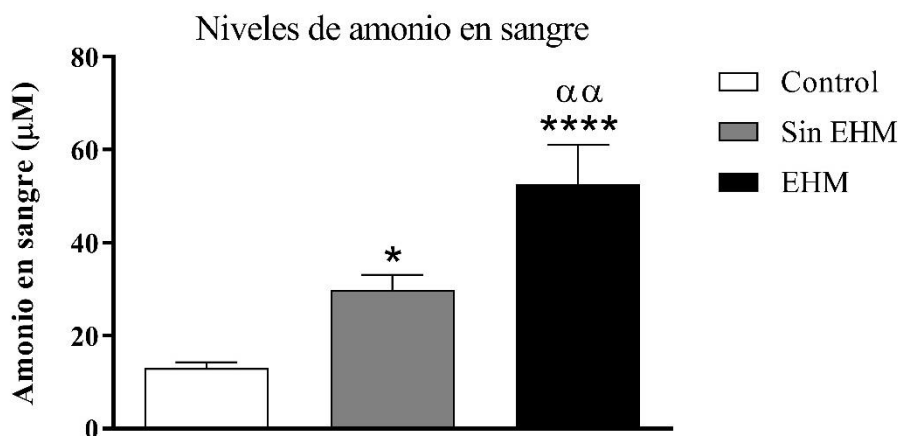
**Tabla 15. Características demográficas, etiológicas y severidad de la enfermedad hepática.**

	Control	Sin EHM	EHM
<b>Total individuos (n°)</b>	43	92	39
<b>Sexo (M/F)</b>	16/27	72/20	28/11
<b>Edad (años)*</b>	61,6 ± 0,8	62,3 ± 0,6	64,3 ± 1,0
<b>Etiología</b>			
Alcohol	-	38	21
VHB/VHC	-	19	3
Alcohol + VHB/VHC	-	7	1
NALFD	-	20	11
Otros	-	8	3
<b>Child Pugh A/B/C</b>	-	87/5/0	32/6/1
<b>MELD*</b>	-	8,5 ± 0,4	10,0 ± 0,9

\*Los valores se presentan como la media ± EEM. M: masculino; F: femenino; VHB: virus hepatitis B; VHC: virus hepatitis C; NALFD: enfermedad de hígado graso no alcohólico.

## 2. Determinación de los niveles de amonio en sangre

El nivel medio de amonio en sangre del grupo Control fue de  $13,01 \pm 1,3 \mu\text{M}$ . Los pacientes cirróticos, debido a la enfermedad hepática, presentaron mayores niveles séricos de amonio respecto al grupo Control (*vs.* Sin EHM  $29,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,05$ ; *vs.* EHM  $52,6 \pm 8,6 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 31). Los niveles de amonio en sangre fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con EHM con respecto al grupo Sin EHM ( $p < 0,01$ ) (Figura 31), lo que podría propiciar y/o favorecer a las alteraciones de este grupo de pacientes.



**Figura 31. Niveles de amonio en sangre en pacientes cirróticos y controles.** Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*:  $p < 0,05$ ;  $\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

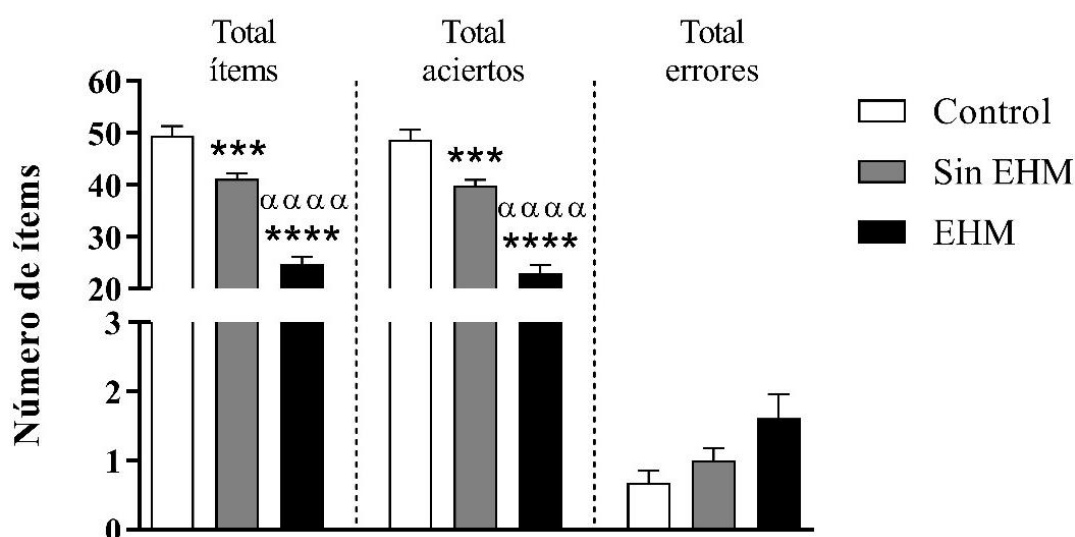
### 3. Estudio de las alteraciones cognitivas

Para el estudio de las alteraciones cognitivas se utilizaron los siguientes test: test Stroop, test oral de claves, test orales de dígitos, test oral de letras y números y el test d2 (ver apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Con estos test se evalúan funciones ejecutivas como la atención selectiva, la velocidad de procesamiento, la memoria de trabajo, la inhibición de la respuesta automática, la atención selectiva-sostenida y la concentración.

#### 3.1. Velocidad de procesamiento y atención selectiva: Test oral de claves

Para el estudio de las alteraciones en la velocidad de procesamiento y atención selectiva se utilizó el test oral de claves, donde los sujetos tienen que rellenar una plantilla de forma oral en base a una tabla de referencia y dentro de un determinado tiempo (ver apartado 4.2.2 de Materiales y Métodos). En este test se registran las casillas completadas, así como las completadas de forma correcta e incorrecta. Con este test se obtienen varios resultados, pero para evaluar las alteraciones en velocidad de procesamiento y atención selectiva se utiliza el número total de aciertos, es decir, de casillas completadas correctamente dentro del tiempo establecido; el total de ítems realizados también refleja la velocidad de procesamiento. El grupo Control obtuvo una media de aciertos totales de  $48,8 \pm 1,9$ . Los pacientes cirróticos lograron significativamente menos aciertos que el grupo Control ( $p$ -valor vs. Sin EHM  $p < 0,001$ ;  $p$ -valor vs. EHM  $p < 0,0001$ ) (Figura 32) (Tabla 16). Dentro del grupo de pacientes cirróticos, los pacientes con EHM obtuvieron un número total de aciertos significativamente menor que los

pacientes Sin EHM ( $p < 0,0001$ ) (Figura 32) (Tabla 16). Esta tendencia también se observó en el número de ítems totales, donde los pacientes con enfermedad hepática realizaron un menor número de ítems totales respecto al grupo Control ( $p$ -valor vs. Sin EHM  $p < 0,001$ ;  $p$ -valor vs. EHM  $p < 0,0001$ ) (Figura 32) (Tabla 16). Dentro del grupo de pacientes, los pacientes con EHM completaron un número menor de ítems totales con respecto al grupo Sin EHM ( $p < 0,0001$ ). En cuanto al total de errores cometidos en la prueba, es decir, casillas completadas de forma incorrecta, se observó una tendencia al aumento en pacientes con EHM, pero sin llegar a ser estadísticamente significativo (Figura 32) (Tabla 16). El menor número total de ítems y de aciertos obtenidos en el grupo EHM reveló un empeoramiento en la velocidad de procesamiento y atención selectiva; estas alteraciones también se observaron en menor medida en los pacientes Sin EHM ( $p < 0,001$ ), lo que pone de manifiesto la incapacidad de la batería PHES para diagnosticar alteraciones cognitivas tempranas en pacientes con enfermedad hepática<sup>167</sup>.

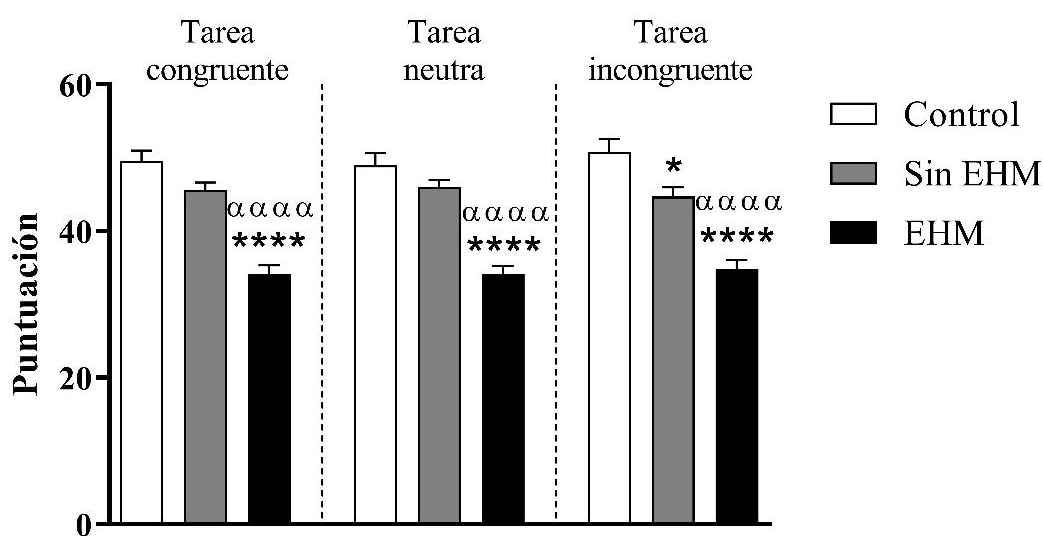


**Figura 32. Resultados obtenidos en el test oral de claves.** Se muestran el número total de casillas completadas (Total ítems), el número de casillas completadas correctamente (Total aciertos) y el número de casillas completadas incorrectamente (Total errores). Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

### 3.2. Flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada: Test Stroop

El test Stroop nos permite evaluar la flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada mediante los valores obtenidos en la tarea incongruente (ver apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos). En la tarea incongruente el sujeto ha de inhibir la respuesta habitual o

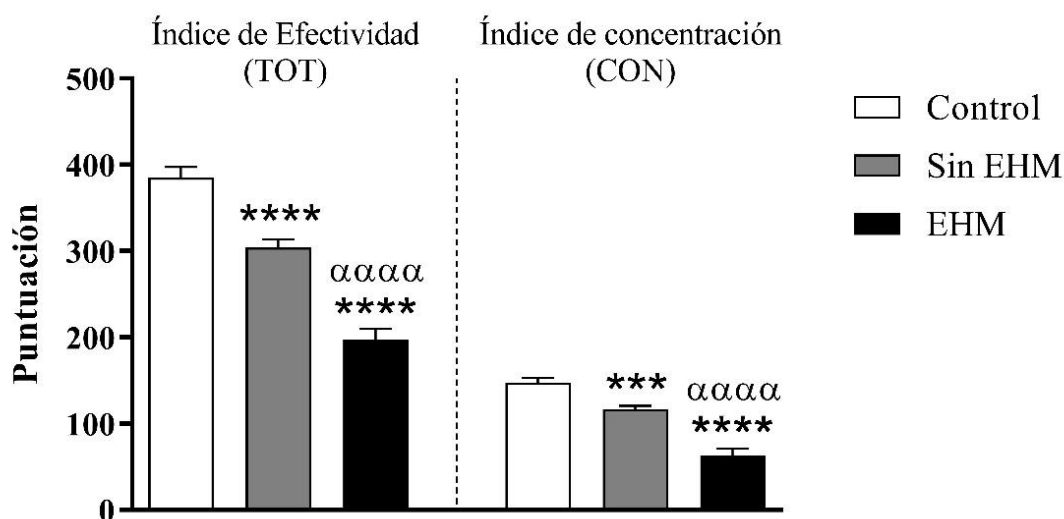
automatizada de leer la palabra y decir el color de la tinta en la cual está escrita la palabra. Tras realizar el test, las puntuaciones se corrigieron por edad y se obtuvieron las puntuaciones definitivas interpolando en una tabla de normalidad para la población española. Los pacientes con EHM presentaron una disminución en la flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada debido a que en la tarea incongruente obtuvieron una puntuación significativamente menor con respecto a los otros grupos de estudio ( $p$ -valor vs. Control  $p<0,0001$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $p<0,0001$ ) (Figura 33) (Tabla 16). Los pacientes Sin EHM también presentaron esta alteración con respecto al grupo Control, pero en menor medida ( $p<0,05$ ) (Figura 33) (Tabla 16). Las tareas congruente y neutra del test Stroop también proporciona información acerca de la velocidad de procesamiento; una menor puntuación en estas pruebas se traduce en una peor velocidad de procesamiento del sujeto. Los pacientes con EHM presentaron una disminución en la velocidad de procesamiento medida por el test Stroop debido a que obtuvieron una puntuación menor en la tarea congruente y neutra con respecto a los demás grupos de estudio (Tarea congruente:  $p$ -valor vs. Control  $p<0,0001$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $p<0,0001$ ) (Tarea neutra:  $p$ -valor vs. Control  $p<0,0001$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $p<0,0001$ ) (Figura 33) (Tabla 16).



**Figura 33. Puntuaciones del test Stroop.** Se muestran los valores de las tareas congruente, neutra e incongruente del test Stroop; se muestran las puntuaciones obtenidas en cada tarea tras ser corregidas por edad y normalizadas con tablas de normalidad para la población española. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*:  $p<0,05$ ; \*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ :  $p<0,0001$ ).

### 3.3. Atención selectiva-sostenida y concentración: Test d2

La evaluación de la atención selectiva-sostenida y concentración se llevó a cabo mediante el test d2, en el cual el sujeto tiene que marcar unos determinados ítems relevantes e ignorar los irrelevantes a lo largo de varias filas, con un determinado tiempo por fila (ver apartado 4.2.5 de Materiales y Métodos). Tras la realización del test se obtienen varios datos con los que se calcula el índice de efectividad (TOT) y el índice de concentración (CON), que nos ayudan a evaluar la atención selectiva-sostenida y la concentración respectivamente. Los pacientes con EHM obtuvieron una puntuación en el índice de efectividad de  $198 \pm 12$ , significativamente menor al obtenido por los otros grupos de estudio ( $p$ -valor vs. Control  $p < 0,0001$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $p < 0,0001$ ) (Figura 34) (Tabla 16). En cuanto al índice de concentración, los pacientes con EHM obtuvieron una puntuación media de  $64 \pm 7$ , significativamente menor que el resto de grupos incluidos en el estudio ( $p$ -valor vs. Control  $p < 0,0001$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $p < 0,0001$ ) (Figura 34) (Tabla 16). Los pacientes Sin EHM también presentaron una disminución respecto al grupo Control en la puntuación obtenida en el índice de efectividad ( $p < 0,0001$ ) y el índice de concentración ( $p < 0,001$ ) (Figura 34) (Tabla 16). Estos resultados indicaron una disminución en funciones de atención selectiva-sostenida y concentración en los pacientes con EHM, que también presentaban los pacientes Sin EHM, pero en menor medida.

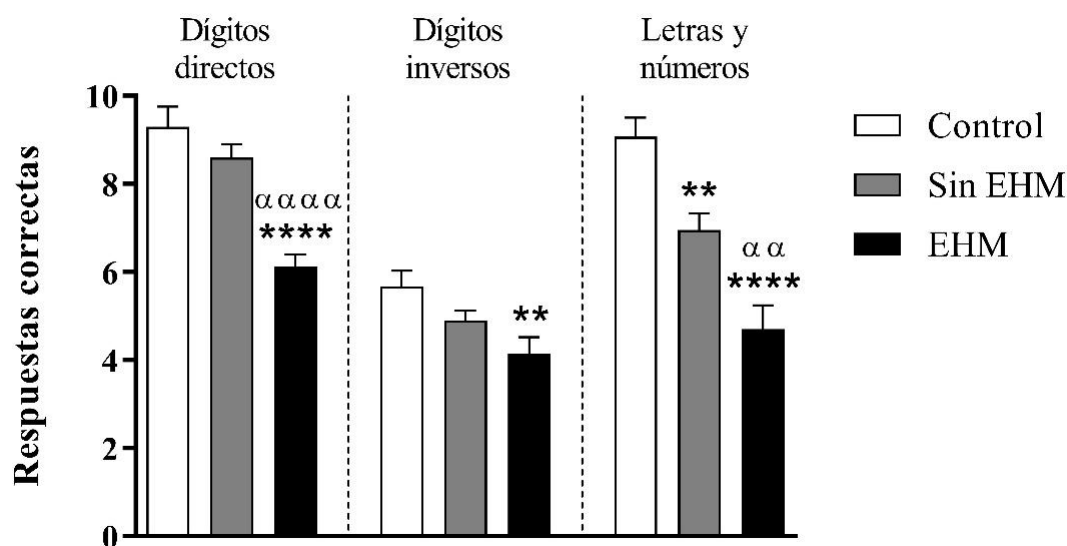


**Figura 34. Índice de efectividad (TOT) e índice de concentración (CON) obtenidos en el test d2.** Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).



### 3.4. Memoria de trabajo: test oral de dígitos y test oral de letras y números

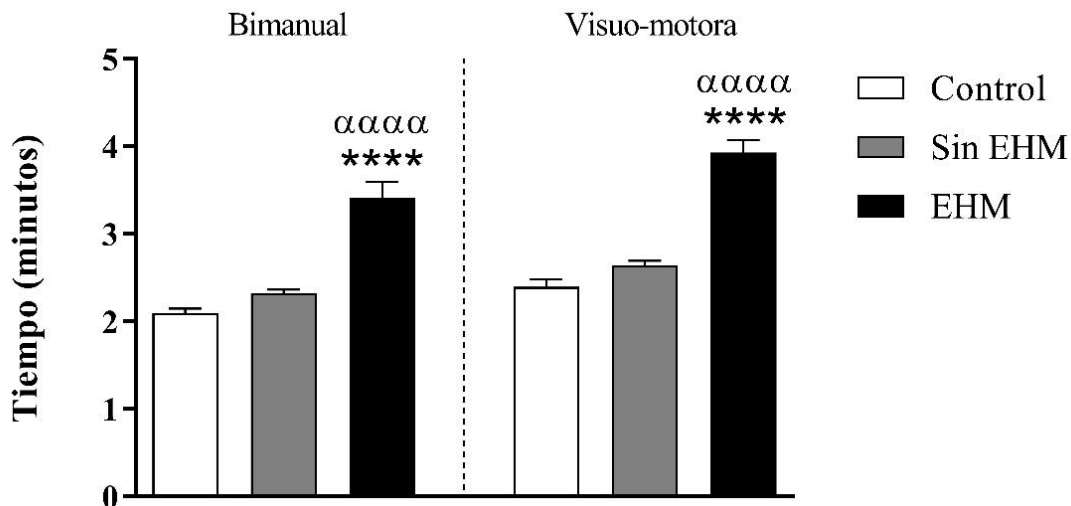
Para evaluar la memoria de trabajo se utilizaron dos test, el test oral de dígitos y el test oral de letras y números (ver apartado 4.2.4 y 4.2.4 de Materiales y Métodos, respectivamente). Estos test se basan en la capacidad del sujeto en retener una serie de ítems y recitarlos posteriormente en un orden concreto. Un menor número de respuestas correctas, es decir, de series recitadas correctamente, indica una deficiencia en la memoria de trabajo. Los pacientes con EHM presentaron un empeoramiento en la memoria de trabajo ya que realizaron un número menor de respuestas correctas en el test oral de dígitos directos ( $p$ -valor vs. Control  $p < 0,0001$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $p < 0,0001$ ) (Figura 35) (Tabla 16), en el test oral de dígitos inversos (vs. Control  $p < 0,01$ ) (Figura 35) (Tabla 16), y en el test oral de letras y números ( $p$ -valor vs. Control  $p < 0,0001$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $p < 0,01$ ) (Figura 35) (Tabla 16). Los pacientes Sin EHM también presentaron una sutil alteración en la memoria de trabajo respecto al grupo Control medida por el test oral de letras y números ( $p$ -valor vs. Control  $p < 0,01$ ) (Figura 35) (Tabla 16).



**Figura 35. Respuestas correctas del test oral de dígitos y el test oral de letras y números.** Se muestran el número de series recitadas correctamente en el test oral de dígitos directo e inverso y en el test oral de letras y números. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*\*/ $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

## 4. Estudio de las alteraciones motoras

El estudio de alteraciones motoras se realizó mediante el test de coordinación bimanual y el test de coordinación visuo-motora (ver apartado 4.3 de Materiales y Métodos). Estos test se basan en la capacidad y velocidad de los sujetos en colocar unos objetos en los huecos que se le presentan en el menor tiempo posible, utilizando las dos manos en el test de coordinación bimanual, o con la mano dominante en el test de coordinación visuo-motora. Los pacientes con EHM presentaron alteraciones en la coordinación motora, ya que requirieron más tiempo para realizar ambos test en comparación con los grupos Control y Sin EHM (Test coordinación bimanual:  $p$ -valor vs. Control  $p < 0,0001$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $p < 0,0001$ ) (Test coordinación visuo-motora:  $p$ -valor vs. Control  $p < 0,0001$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $p < 0,0001$ ) (Figura 36) (Tabla 15).



**Figura 36. Resultados obtenidos en los test de coordinación bimanual y visuo-motora.** Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*\*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

**Tabla 16. Alteraciones cognitivas y motoras.** Se muestran los resultados obtenidos en los test psicométricos realizados.

Test	Puntuación		
	Control	Sin EHM	EHM
<b>Velocidad de procesamiento y atención selectiva: test oral de claves</b>			
Total ítems	49,4 ± 1,9	41,2 ± 1,0***	24,6 ± 1,5****/αααα
Total aciertos	48,8 ± 1,9	39,9 ± 1,1***	23,0 ± 1,5****/αααα
Total errores	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,3
<b>Flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada: test Stroop</b>			
Tarea congruente	49,6 ± 1,4	45,6 ± 1,1	34,1 ± 1,2****/αααα
Tarea neutra	49,0 ± 1,6	46,9 ± 1,0	34,1 ± 1,1****/αααα
Tarea incongruente	50,8 ± 1,7	44,7 ± 1,2*	34,8 ± 1,2****/αααα
<b>Atención selectiva-sostenida y concentración: test d2</b>			
TR	404 ± 13	330 ± 9***	233 ± 13****/αααα
TA	147 ± 7	122 ± 5**	79 ± 5****/αααα
O	17 ± 4	18 ± 2	19 ± 4
C	2 ± 1	4 ± 1	15 ± 3****/αααα
TOT	385 ± 12	303 ± 10****	198 ± 12****/αααα
CON	148 ± 5	117 ± 4***	64 ± 7****/αααα
<b>Memoria de trabajo: test oral de dígitos y letras y números</b>			
Dígitos directos	9,3 ± 0,5	8,6 ± 0,3	6,2 ± 0,3****/αααα
Dígitos inversos	5,7 ± 0,4	4,9 ± 0,2	4,2 ± 0,4**
Letras y números	9,0 ± 0,4	7,0 ± 0,4**	4,7 ± 0,5****/αα
<b>Coordinación motora: test de coordinación motora</b>			
Bimanual <sup>a</sup>	2,09 ± 0,05	2,32 ± 0,04	3,42 ± 0,18****/αααα
Visuo-motora <sup>a</sup>	2,40 ± 0,08	2,64 ± 0,05	3,93 ± 0,14****/αααα

Los valores se presentan como la media ± EEM. <sup>a</sup>: minutos. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con α. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*/αα:  $p < 0,01$ ; \*\*\*/ααα:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*/αααα:  $p < 0,0001$ ).

## 5. Estudio de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica

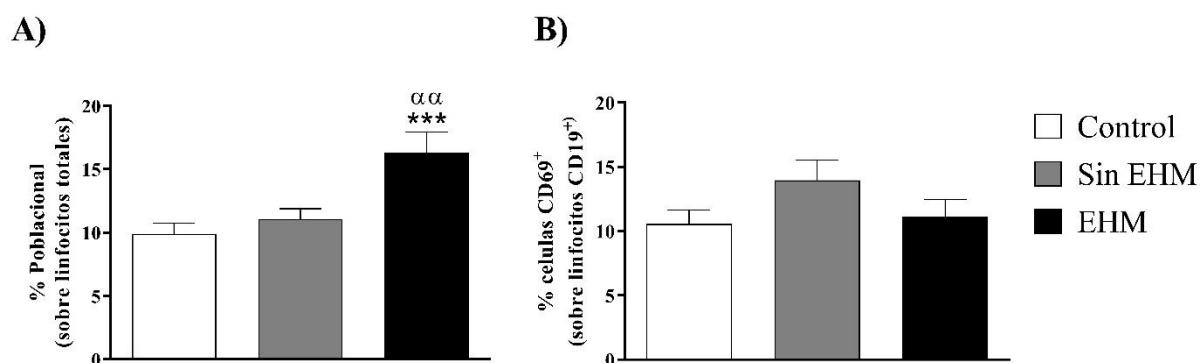
Estudios previos del grupo demuestran que la EHM se asocia con cambios específicos en el inmunofenotipo. Los principales cambios que se detectaron fueron un aumento de los monocitos pro-inflamatorios, aumento de linfocitos T autorreactivos y un aumento en la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, así como de sus subpoblaciones naïve y de memoria<sup>112</sup>. Estos resultados sugieren que los linfocitos TCD4<sup>+</sup> podrían tener un papel clave en el cambio de la inflamación periférica que desencadena la aparición de EHM en pacientes cirróticos. Por ello, caracterizamos las poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo, centrándonos en las poblaciones efectoras de linfocitos T *helper*, linfocitos Tregs, así como las diferentes subpoblaciones de linfocitos B y su activación.

## 5.1. Linfocitos B

En el análisis de los linfocitos B nos centramos en la proporción de linfocitos B dentro del total de linfocitos, así como de sus poblaciones naïve, de memoria y subpoblaciones de memoria y células efectoras o plasmoblastos. También se analizaron los niveles de varias moléculas de interés relacionadas con la maduración, diferenciación y proliferación de linfocitos B como BAFF, APRIL y BDNF, así como la IgA.

### 5.1.1. Linfocitos B totales

El estudio de la población de linfocitos B totales reveló un aumento significativo en la proporción de linfocitos B totales en pacientes con EHM ( $16,3 \pm 1,6$  %) con respecto al resto de grupos incluidos en el estudio (vs. Control  $9,9 \pm 0,8$  %;  $p < 0,001$ ; vs. Sin EHM  $11,1 \pm 0,8$  %;  $p < 0,01$ ) (Figura 37A). En cuanto al estudio de su activación, medida por la expresión del marcador CD69, no se apreciaron diferencias en el porcentaje de células activadas (Control  $10,6 \pm 1,1$  %; Sin EHM  $14,0 \pm 1,6$  %; EHM  $11,1 \pm 1,3$  %) (Figura 37B).



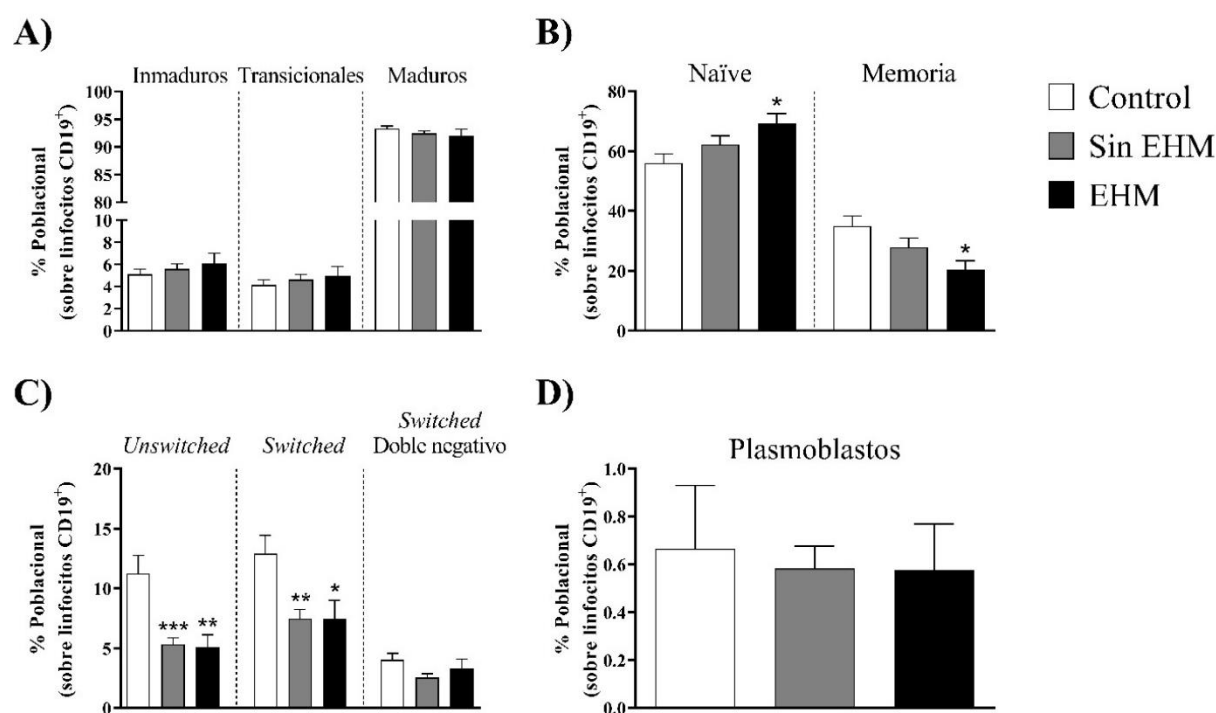
**Figura 37. Porcentaje y activación de linfocitos B totales.** A) Porcentaje total de linfocitos B sobre el total de linfocitos. B) Porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) dentro la población de linfocitos B totales. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . ( $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

### 5.1.2. Subpoblaciones de linfocitos B

No se encontraron diferencias en la proporción de linfocitos B inmaduros, transicionales y maduros en sangre periférica de los sujetos de estudio, solo una tendencia en pacientes con EHM a aumentar la proporción de linfocitos B inmaduros y transicionales y a disminuir la de los maduros (Figura 38A) (Tabla 17).

En pacientes con EHM se observó un aumento significativo de fenotipos naïve de linfocitos B ( $p<0,05$ ) y una disminución de los fenotipos de memoria ( $p<0,05$ ) con respecto al grupo Control (Figura 38B) (Tabla 17). El grupo Control presentó un porcentaje de linfocitos B de memoria *unswitched* significativamente mayor que los pacientes con enfermedad hepática (*vs.* Sin EHM  $p<0,001$ ; *vs.* EHM  $p<0,01$ ) (Figura 38C) (Tabla 17). De igual forma sucede con los linfocitos B de memoria *switched*: en el grupo Control se observó un porcentaje celular significativamente mayor al encontrado en sujetos con enfermedad hepática (*vs.* Sin EHM  $p<0,01$ ; *vs.* EHM  $p<0,05$ ) (Figura 38C) (Tabla 17). En resumen, en estos subtipos de linfocitos B memoria se observó una reducción significativa de los linfocitos B de memoria *unswitched* y *switched* en pacientes con enfermedad hepática, mientras que en los linfocitos B de memoria *switched* doble negativo no se apreciaron diferencias entre los grupos de estudio.

También se estudió la proporción de los plasmoblastos, células precursoras de las células plasmáticas especializadas en sintetizar anticuerpos. No existían diferencias significativas en la proporción de plasmoblastos presentes en sangre periférica de los grupos de estudio (Figura 38D) (Tabla 17).



**Figura 38. Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos B.** Se representan los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos B referidos a la población de linfocitos B totales. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). (\*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ ).

**Tabla 17. Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos B.** Se muestran los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos B referidos a la población de linfocitos B totales.

Población	% Poblacional (sobre linfocitos CD19 <sup>+</sup> )		
	Control	Sin EHM	EHM
Inmaduros	5,1 ± 0,5	5,6 ± 0,5	6,1 ± 0,9
Transicionales	4,1 ± 0,5	4,6 ± 0,4	5,0 ± 0,8
Maduros	93,3 ± 0,5	92,5 ± 0,4	92,0 ± 1,2
Naïve	56,0 ± 3,2	62,3 ± 2,9	69,3 ± 3,3*
Memoria	35,0 ± 3,3	28,0 ± 3,0	20,3 ± 3,0*
<i>Unswitched</i>	11,2 ± 1,5	5,3 ± 0,5***	5,1 ± 1,0**
<i>Switched</i>	12,9 ± 1,5	7,5 ± 0,7**	7,5 ± 1,5*
<i>Switched</i> Doble negativo	4,0 ± 0,5	2,5 ± 0,3	3,3 ± 0,8
Plasmoblastos	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2

Los valores se presentan como la media ± EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

En cuanto a la activación, no existían diferencias significativas en las subpoblaciones de linfocitos B entre los grupos de estudio (Tabla 18).

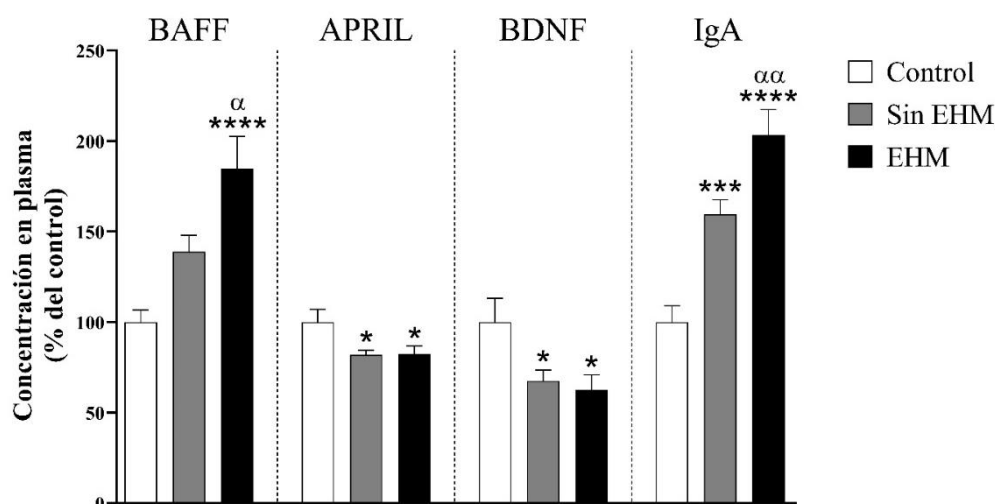
**Tabla 18. Activación de subpoblaciones de linfocitos B.** Se muestra el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) de cada población dentro del total de la población estudiada.

Población	Células activadas (% células CD69 <sup>+</sup> dentro de la población)		
	Control	Sin EHM	EHM
Inmaduros	8,6 ± 0,7	11,3 ± 1,0	11,36 ± 1,3
Transicionales	6,9 ± 0,9	9,4 ± 1,1	9,5 ± 1,3
Maduros	9,0 ± 0,6	11,4 ± 1,2	10,8 ± 1,5
Naïve	7,9 ± 0,9	12,9 ± 1,8	10,2 ± 1,8
Memoria	11,8 ± 0,9	15,0 ± 1,2	12,7 ± 1,6
<i>Unswitched</i>	12,2 ± 0,8	12,2 ± 0,9	15,4 ± 2,6
<i>Switched</i>	6,3 ± 0,5	6,7 ± 0,7	8,6 ± 1,8
<i>Switched</i> Doble negativo	7,8 ± 1,1	10,4 ± 1,4	8,3 ± 1,6
Plasmoblastos	37,0 ± 5,7	44,24 ± 4,6	34,2 ± 7,1

Los valores se presentan como la media ± EEM.

### 5.1.3. Análisis de niveles de BAFF, APRIL, BDNF e IgA en plasma

Los niveles de APRIL y BDNF en plasma de pacientes con enfermedad hepática eran significativamente menores a los observados en el grupo Control ( $p < 0,05$ ) (Figura 39) (Tabla 19). En cuanto a BAFF e IgA, sus niveles eran significativamente mayores en plasma de pacientes con EHM (BAFF: vs. Control  $p < 0,0001$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (IgA: vs. Control  $p < 0,0001$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,01$ ) (Figura 39) (Tabla 19). En pacientes Sin EHM los niveles de IgA también eran más elevados con respecto al grupo Control ( $p < 0,001$ ), aunque menores que los del grupo EHM (Figura 39) (Tabla 19).



**Figura 39. Nivel de BAFF, APRIL, BDNF e IgA en plasma.** Los niveles se expresan como incremento, en porcentaje, con respecto al grupo control. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

**Tabla 19. Nivel de BAFF, APRIL, BDNF e IgA en plasma.** Los niveles se expresan como incremento, en porcentaje, con respecto al grupo control.

Molécula	Nivel de expresión (% del control)		
	Control	Sin EHM	EHM
BAFF	100,0 $\pm$ 6,7	138,8 $\pm$ 9,1	184,8 $\pm$ 17,8****/α
APRIL	100,0 $\pm$ 6,9	81,9 $\pm$ 2,6*	82,3 $\pm$ 4,4*
BDNF	100,0 $\pm$ 13,1	67,4 $\pm$ 6,0*	62,7 $\pm$ 8,2*
IgA	100,0 $\pm$ 9,0	159,5 $\pm$ 7,9***	203,5 $\pm$ 13,78****/αα

Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM del incremento, en porcentaje, con respecto al grupo control. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

## 5.2. Linfocitos T CD4<sup>+</sup>

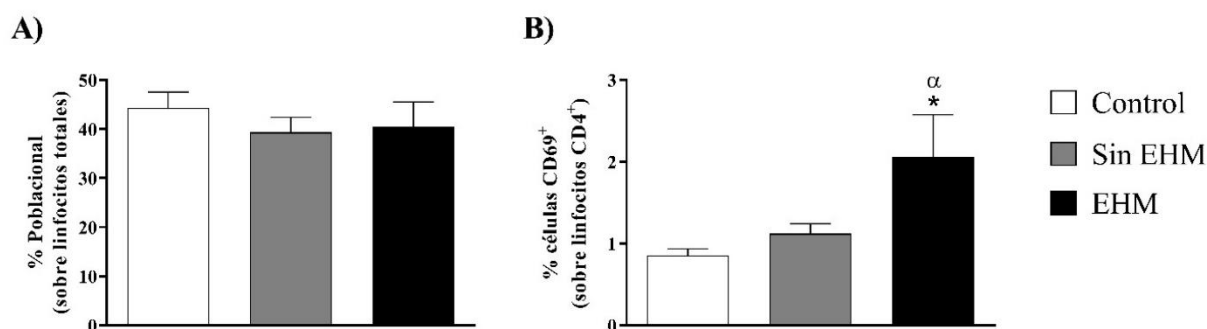
En estudios anteriores del grupo ya se analizó la proporción de linfocitos T naïve y de memoria, observándose un aumento de poblaciones de linfocitos de memoria y una disminución de los linfocitos naïve en pacientes respecto a los controles sanos, además de una expansión de los linfocitos T autorreactivos<sup>112</sup>. Como continuación de estos estudios analizamos los cambios en el inmunofenotipo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, profundizando en el análisis de los subtipos efectores y reguladores.

### 5.2.1. Linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales

No se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales entre los grupos en estudio (Figura 40A). Sin embargo, se observó un aumento en el porcentaje de

## Resultados

células activadas en pacientes con EHM ( $2,1 \pm 0,5$  %) con respecto al resto de grupos (vs. Control  $0,9 \pm 0,1$  %;  $p < 0,05$ ; vs. Sin EHM  $1,1 \pm 0,1$  %;  $p < 0,05$ ) (Figura 40B).



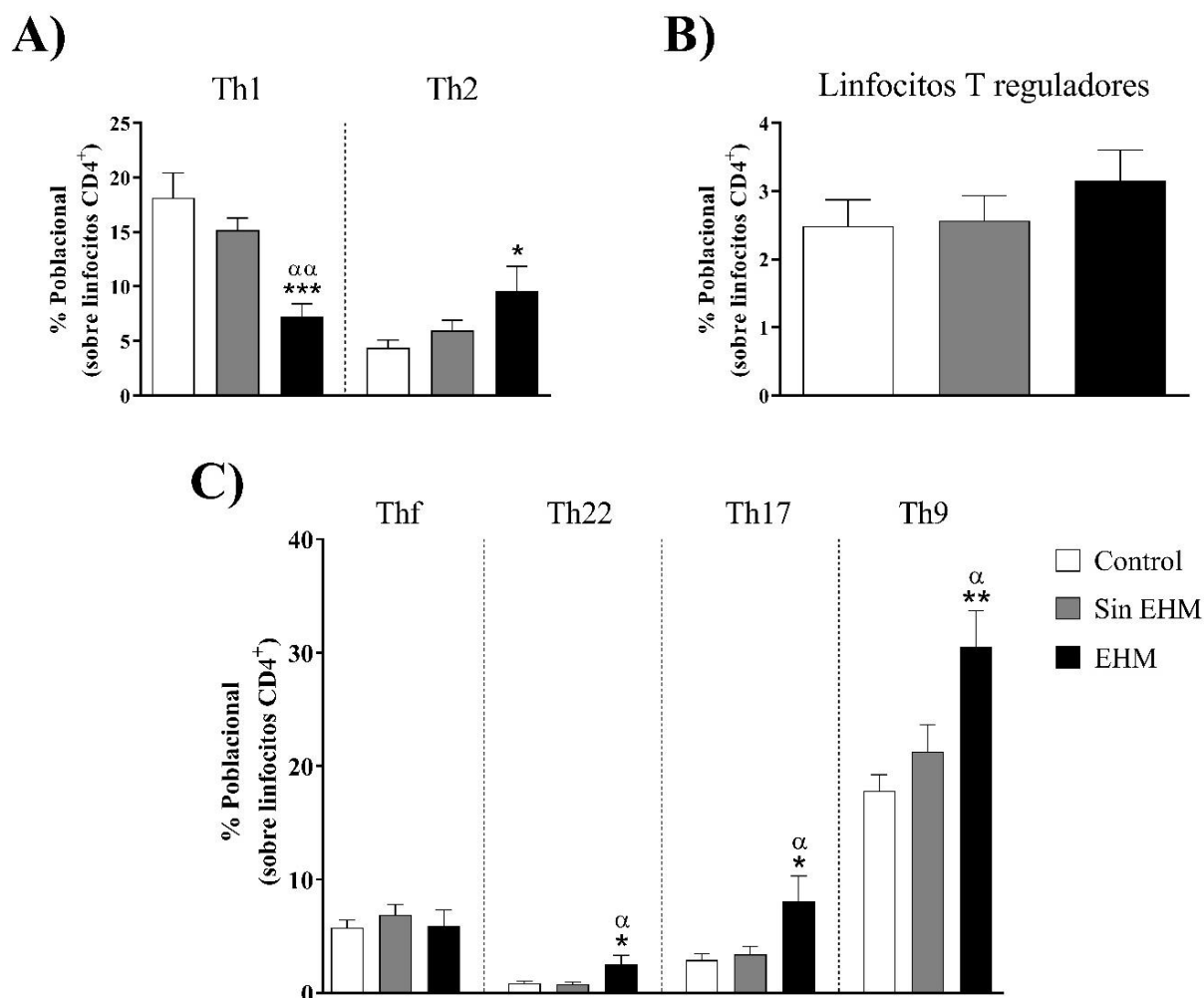
**Figura 40. Porcentaje y activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales.** Se representa **A)** el porcentaje total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> sobre el total de linfocitos, así como **B)** el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) dentro la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ).

### 5.2.2. Subpoblaciones linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se pueden diferenciar en varios subtipos efectores, cada uno de los cuales posee funciones específicas dentro de las condiciones fisiológicas o patológicas, actuando como células con función anti-inflamatoria o pro-inflamatoria, así como células cooperantes en otros procesos. Entre las células a las cuales se atribuyen funciones anti-inflamatorias encontramos a los linfocitos Th2 o las células Tregs, mientras que entre las que presentan funciones pro-inflamatorias podemos encontrar a los linfocitos Th1, Th22, Th9 o Th17, estas últimas también relacionadas con procesos autoinmunes.

Los pacientes con EHM presentaron una disminución en el porcentaje linfocitos Th1 significativamente menor que el grupo Control ( $p < 0,001$ ) y los pacientes Sin EHM ( $p < 0,01$ ) (Figura 41A) (Tabla 20). En contraposición, el porcentaje de linfocitos Th2 estaba aumentado significativamente en pacientes con EHM respecto al grupo Control ( $p < 0,05$ ) (Figura 41A) (Tabla 20). Los fenotipos reguladores (linfocitos Tregs) (Figura 41B) y Thf (Figura 41C) no tenían alterada su proporción en sangre periférica entre los grupos de estudio (Tabla 20). En cuanto a los fenotipos pro-inflamatorios Th22, Th17 y Th9, se observó un aumento en su porcentaje en pacientes con EHM respecto al grupo Control y Sin EHM (Th22: vs. Control  $p < 0,05$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (Th17: vs. Control  $p < 0,05$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (Th9: vs. Control  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (Figura 41C) (Tabla 20).





**Figura 41. Porcentaje de subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.** Se representan los diferentes porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> referidos a la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ; \*\*/ $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$ ).

**Tabla 20. Porcentaje de subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

Población	% Poblacional (sobre linfocitos T CD4 <sup>+</sup> )		
	Control	Sin EHM	EHM
Th1	18,1 $\pm$ 2,3	15,2 $\pm$ 1,1	7,3 $\pm$ 1,2***/ $\alpha\alpha$
Th2	4,4 $\pm$ 0,9	6,0 $\pm$ 0,9	9,6 $\pm$ 2,3*
Tregs	2,5 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,4
Thf	5,8 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 0,9	5,9 $\pm$ 1,4
Th22	0,9 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,8*/ $\alpha$
Th17	2,9 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,7	8,1 $\pm$ 2,2*/ $\alpha$
Th9	17,9 $\pm$ 1,4	21,3 $\pm$ 2,4	30,5 $\pm$ 3,2***/ $\alpha$

Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> referidos a las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ; \*\*/ $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$ ).

## Resultados

En cuanto a la activación, no existían diferencias significativas en las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores entre los grupos de estudio (Tabla 21).

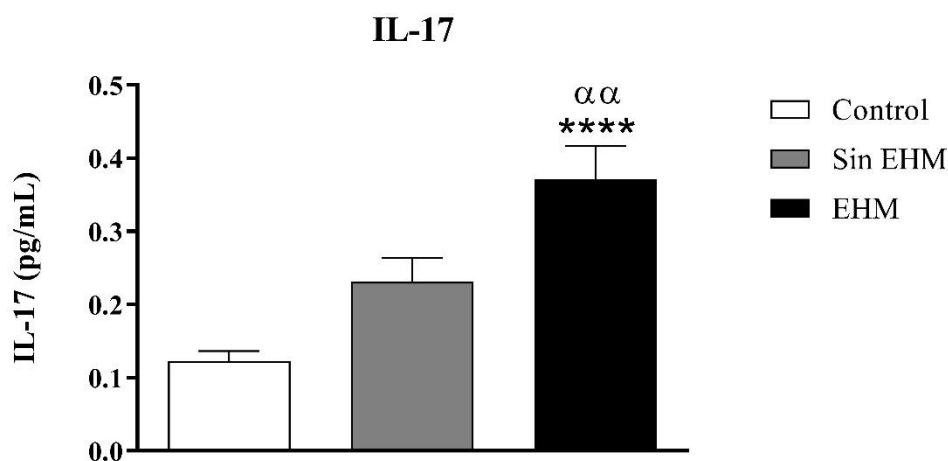
**Tabla 21. Activación de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

Población	Células activadas (% células CD69 <sup>+</sup> dentro de la población)		
	Control	Sin EHM	EHM
Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	2,1 ± 0,5 <sup>*/α</sup>
Th1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Th2	1,5 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,6
Tregs	24,4 ± 4,4	17,1 ± 2,1	14,0 ± 2,3
Thf	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,4
Th22	2,8 ± 0,8	4,1 ± 0,8	4,0 ± 1,3
Th17	2,0 ± 0,3	2,45 ± 0,4	2,9 ± 0,8
Th9	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,3

Los valores se presentan como la media ± EEM del porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) de cada población dentro del total de la población estudiada. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con α. (\* / α:  $p < 0,05$ ).

### 5.2.3. Análisis de los niveles de IL-17 en plasma

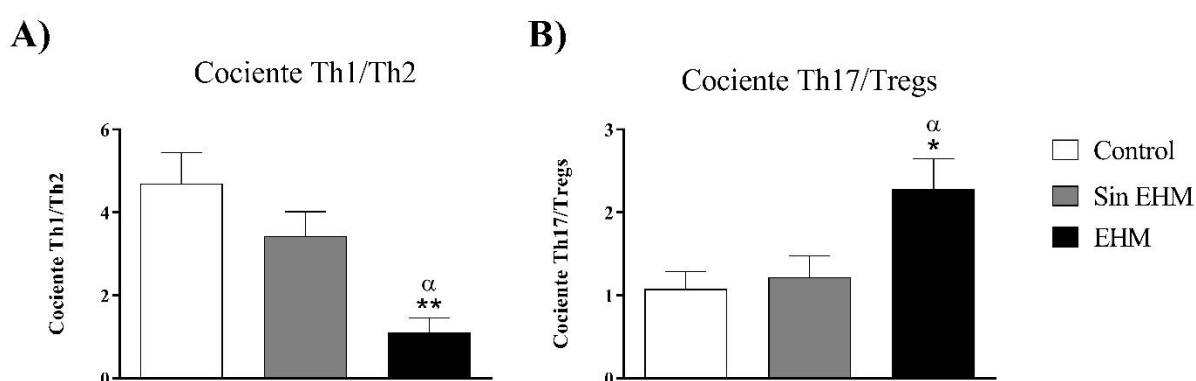
Dada la relación con el subtipo de linfocitos Th17, se midieron en los sujetos de estudio los niveles de plasma de IL-17, citocina característica de este tipo celular. La concentración de IL-17 fue significativamente mayor en pacientes con EHM con respecto al resto de grupos de estudio (EHM  $0,37 \pm 0,05$  pg/mL vs. Control  $0,12 \pm 0,01$ ;  $p < 0,0001$ ; vs. Sin EHM  $0,23 \pm 0,03$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 42).



**Figura 42. Nivel de IL-17 en plasma.** Los niveles se expresan como concentración en pg/mL. Los valores se representan como la media ± EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con α. (αα:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

### 5.2.4. Cociente Th1/Th2 y Th17/Tregs

El cálculo del cociente entre dos poblaciones nos permite analizar el balance pro-inflamatorio/anti-inflamatorio dentro de cada sujeto de estudio, es decir, evaluar si en cada sujeto los fenotipos pro-inflamatorios están aumentados, disminuidos o en igual proporción a los fenotipos anti-inflamatorios. Los pacientes con EHM presentaron un cociente Th1/Th2 significativamente menor al presentado en los sujetos Control o Sin EHM (EHM  $1,1 \pm 0,3$  vs. Control  $4,7 \pm 0,7$ ;  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $3,4 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 42A). Por el contrario, en los pacientes con EHM se observó un aumento del cociente Th17/Tregs hasta un valor de  $2,3 \pm 0,4$ , significativamente mayor al del resto de grupos incluidos en el estudio (vs. Control  $1,1 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ; vs. Sin EHM  $1,2 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 42B).



**Figura 43. Cociente Th1/Th2 y Th17/Tregs.** Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

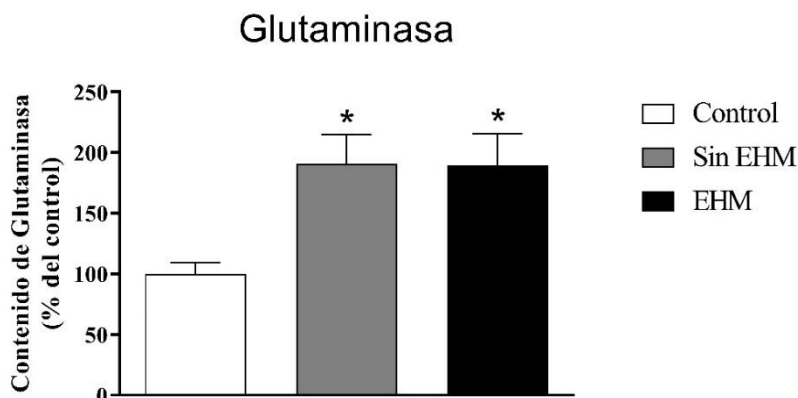
## 6. Estudio de la expresión génica y del contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

### 6.1. Contenido proteico de glutaminasa en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

El amonio en sangre tiene un papel clave en la patología de la EHM, ya que estudios anteriores postulan que el aumento de la inflamación periférica y el amonio circulantes actuarían sinérgicamente en el desarrollo del deterioro cognitivo<sup>29,281,402</sup>. Por ello, analizamos la expresión proteica de la glutaminasa en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como enzima clave en el metabolismo del amonio, la cual cataliza el paso de glutamina a glutamato liberando el ion amonio.

## Resultados

El contenido proteico de glutaminasa en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con cirrosis estaba aumentado con respecto al grupo Control (vs. Sin EHM 190,6 ± 24,4 % de los controles;  $p < 0,05$ ; vs. EHM 189,5 ± 25,9 % de los controles;  $p < 0,05$ ) (Figura 44).



**Figura 44. Contenido proteico de glutaminasa en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.** Se representa el incremento en porcentaje del contenido proteico de glutaminasa en linfocitos T CD4<sup>+</sup> con respecto al grupo Control. Los valores se representan como la media ± EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). (\*:  $p < 0,05$ ).

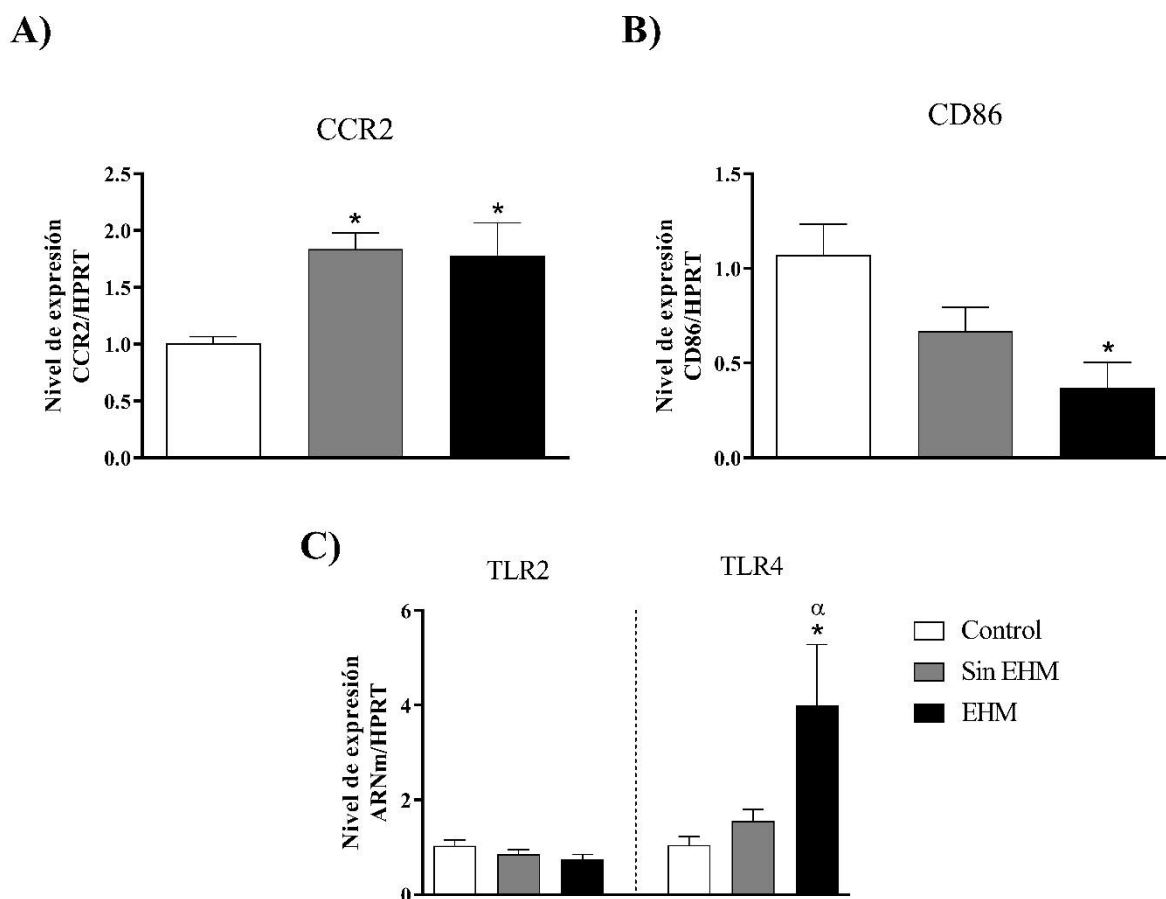
## 6.2. Expresión génica de receptores de membrana en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Se analizó, mediante RT-qPCR, la expresión del ARNm para TLR2, TLR4, CCR2 y CD86 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> para estudiar si su expresión estaba alterada y si esta alteración pudiese favorecer los cambios en inflamación periférica observada en pacientes con EHM<sup>26,112</sup> o en la infiltración linfocitaria en el SNC que se hipotetiza en pacientes EHM y que sí se observó en pacientes con EH<sup>73</sup>.

El análisis de la expresión del ARNm se relativizó en base al grupo Control, a cuya expresión se da el valor 1, de modo que un aumento o disminución de este valor en el resto de grupos se traduce en un aumento o disminución en la expresión de dicho ARNm, respectivamente. El nivel de expresión del ARNm de CCR2 estaba aumentado en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes Sin EHM y con EHM con respecto al grupo Control; en concreto observamos un nivel de expresión en pacientes Sin EHM de 1,8 ± 0,1 ( $p < 0,05$ ) y de 1,8 ± 0,3 en pacientes con EHM ( $p < 0,05$ ) (Figura 45A). En cuanto a la expresión de CD86, ésta se encontraba disminuida en pacientes con EHM con respecto al grupo Control (vs. EHM 0,4 ± 0,1;  $p < 0,05$ ) (Figura 45B).

Con respecto a los TLR, cuya función es la detección de antígenos microbianos, analizamos la expresión de TLR2 y TLR4 como sensores de los dos grupos de bacterias principales: Gram +

(cuyos antígenos son detectados por TLR2) y Gram – (cuyos antígenos son detectados por TLR4). La expresión de TLR2 no variaba entre grupos. En cuanto a la expresión de TLR4, estaba aumentada en pacientes con EHM ( $4,0 \pm 1,3$ ) con respecto a los otros grupos de estudio (vs. Control  $1,0 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ; vs. Sin EHM  $1,6 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 45C).



**Figura 45. Nivel de expresión de los receptores CCR2, CD86, TLR2 y TLR4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.** Los niveles de expresión se normalizan mediante un gen endógeno (HPRT1) y se relativizan al nivel de expresión de los controles, el cual se considera 1. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . ( $*/\alpha: p < 0,05$ ).

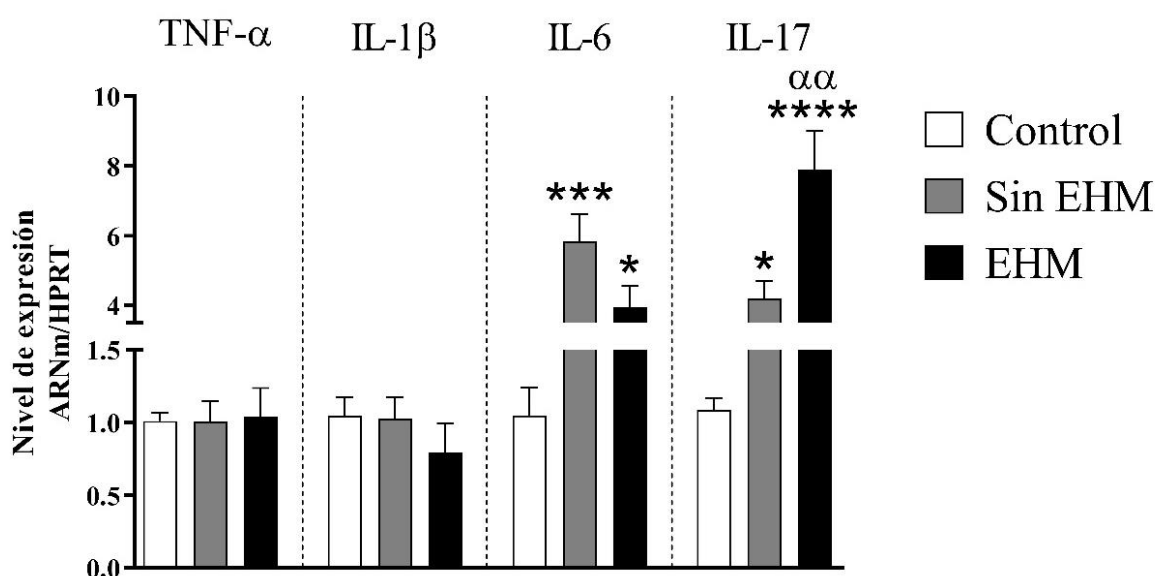
### 6.3. Expresión génica y contenido proteico de citocinas en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Los pacientes con EHM presentan un aumento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias en sangre, lo cual conlleva un ambiente pro-inflamatorio que propiciaría las alteraciones observadas en estos pacientes. Algunas de las citocinas que se encuentran aumentadas en sangre de pacientes con EHM son TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17<sup>112</sup>. Analizamos la expresión génica de estas citocinas en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, para estudiar si las alteraciones de la expresión

## Resultados

en estas células serían las responsables de los niveles altos de estas citocinas en sangre de pacientes con EHM.

Se observó un aumento en la expresión en los niveles de ARNm de IL-6 e IL-17 en ambos grupos de pacientes con respecto al grupo Control (IL-6: Control  $1,0 \pm 0,2$  vs. Sin EHM  $5,8 \pm 0,8$ ;  $p < 0,001$ ; vs. EHM  $4,0 \pm 0,6$  %;  $p < 0,05$ ) (IL-17: Control  $1,0 \pm 0,1$  vs. Sin EHM  $4,2 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ; vs. EHM  $7,9 \pm 1,1$  %;  $p < 0,0001$ ) (Figura 46). En pacientes con EHM, el aumento en la expresión del ARNm de IL-17 estaba significativamente más elevado que en pacientes Sin EHM ( $p < 0,01$ ) (Figura 46). No se detectó una expresión diferencial en linfocitos T CD4<sup>+</sup> del mensajero de las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  entre los grupos de estudio (Figura 46).

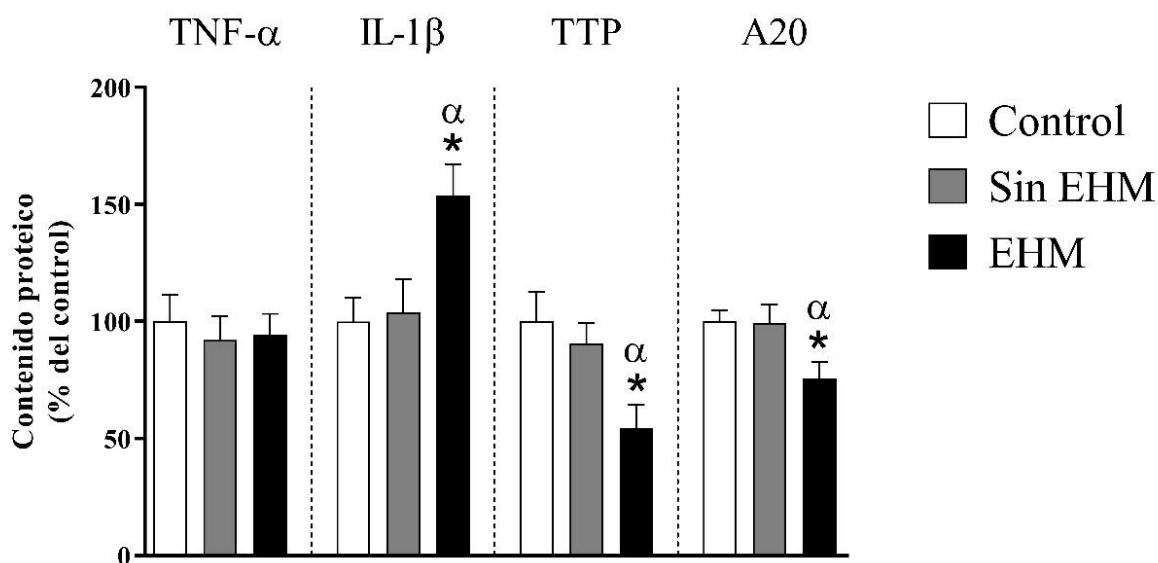


**Figura 46. Nivel de expresión de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.** Los niveles de expresión se normalizan mediante un gen endógeno (HPRT1) y se expresan en relación al nivel de expresión de los controles, que se considera 1. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*:  $p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

Los niveles aumentados de la expresión del ARNm de IL-6 e IL-17 favorecerían los niveles séricos aumentados en pacientes con EHM; en cambio, pese a que no se detecte alteración en la expresión génica de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sí se ven aumentados sus niveles séricos. Para examinar si existía alguna modulación en el proceso de traducción del mensajero a proteína se analizó por *western blot* el contenido proteico de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, así como dos proteínas que regulan negativamente este proceso de traducción, como TTP y A20<sup>89,91</sup>.

El contenido proteico de TNF- $\alpha$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> no varió entre los grupos de estudio, mientras que el contenido proteico de la IL-1 $\beta$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM sí

que estaba aumentado respecto al resto de grupos de estudio (EHM  $154,0 \pm 13,0$  % de los controles,  $p$ -valor vs. Control  $p < 0,05$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $103,4 \pm 14,5$  % de los controles;  $p < 0,05$ ) (Figura 47), lo cual favorecería los niveles altos en sangre. El contenido de TTP y A20 está disminuido en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM (TTP: EHM  $54,6 \pm 9,8$  % de los controles,  $p$ -valor vs. Control;  $p < 0,05$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $90,6 \pm 9,7$  % de los controles;  $p < 0,05$ ) (A20: EHM  $75,5,0 \pm 7,3$  % de los controles,  $p$ -valor vs. Control  $p < 0,05$ ;  $p$ -valor vs. Sin EHM  $99,4 \pm 7,9$  % de los controles;  $p < 0,05$ ) (Figura 47).



**Figura 47. Contenido proteico de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TTP y A20 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.** Se representa el incremento en porcentaje del contenido proteico con respecto al control de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TTP y A20 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ).

## 7. Estudio del contenido proteico en vesículas extracelulares aisladas de plasma

### 7.1. Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares

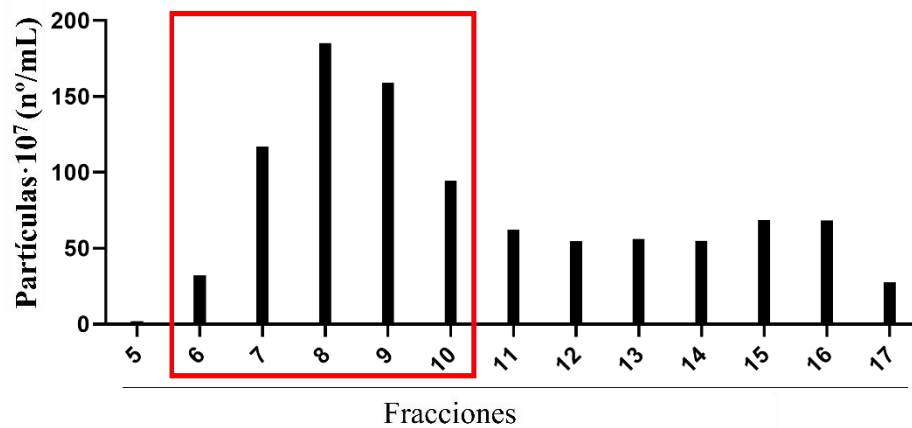
Para los estudios relativos a VE se utilizaron vesículas aisladas de plasma de sujetos sanos y pacientes. La metodología utilizada para el aislamiento fue la cromatografía de exclusión por tamaño (ver apartado 9.1 de Materiales y métodos).

Previamente al aislamiento de las VE utilizadas en el estudio, se determinó, mediante NTA, que el mayor número de vesículas se concentraban de la fracción F6 a la F10 (Figura 48A). Mediante tinción con azul Coomassie del gel de poliacrilamida, se confirmó que estas fracciones no contenían proteínas plasmáticas, sino que estas eluían en fracciones posteriores

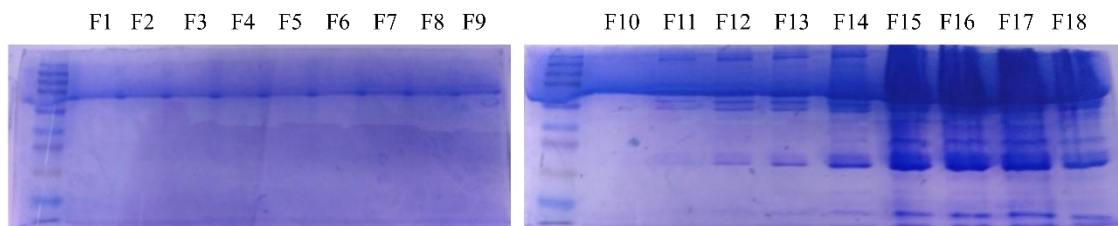
## Resultados

(Figura 48B). Estas comprobaciones se realizaron para confirmar que las fracciones de la F6 a la F10 estaban enriquecidas en VE y sin contaminación por proteínas plasmáticas, como sugiere el protocolo de la casa comercial de las columnas qEV (IZON Science), y que éstas eran las fracciones que debían concentrarse para obtener la muestra de VE.

A)



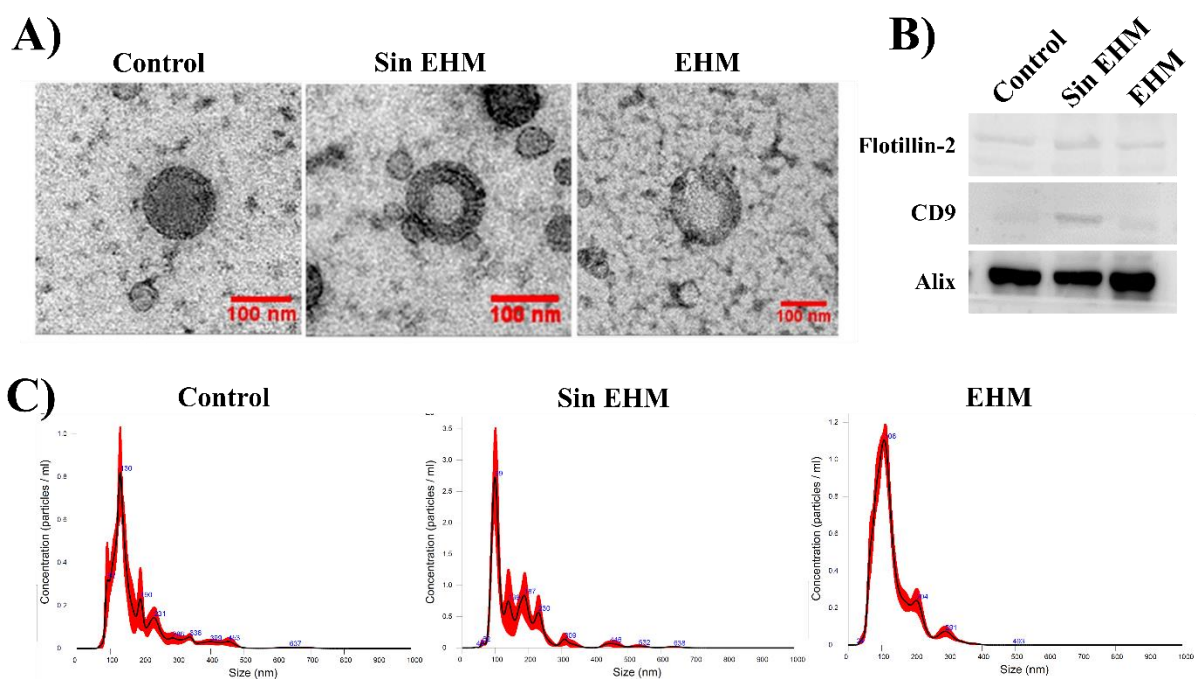
B)



**Figura 48. Determinación de la concentración de partículas y ausencia de proteínas plasmáticas en las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión por tamaño.** A) Concentración de partículas (partículas/mL) de fracciones F5 a F17 mediante análisis de NTA, y B) gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de fracciones F1 a F18.

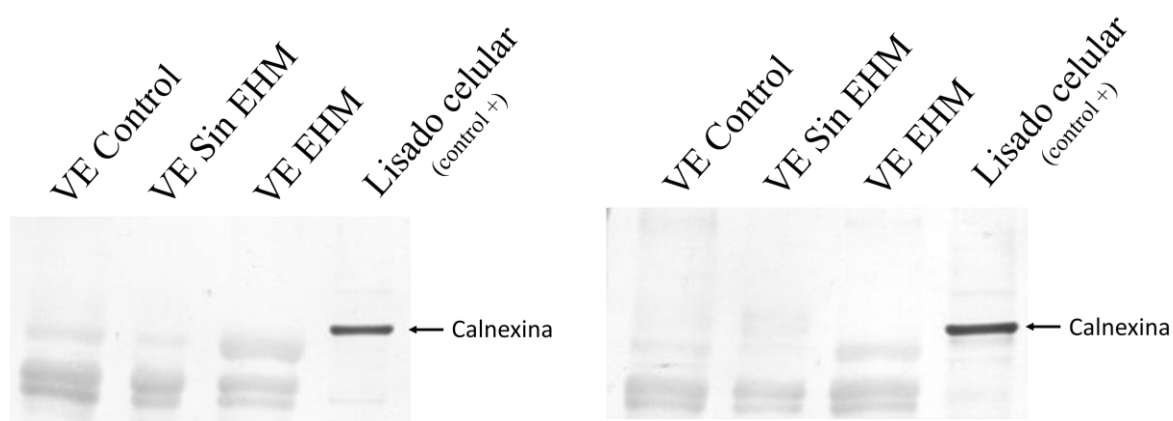
Una vez obtenida la muestra de VE de los tres tipos de sujetos incluidos en el estudio, se confirmó la presencia de vesículas mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 49A), expresión de marcadores específicos de vesículas por *western blot* como flotillin-2, CD9 y Alix (Figura 49B) y por NTA (Figura 49C).





**Figura 49. Confirmación de la presencia de VE aisladas de plasma.** Tras el aislamiento de las VE a partir de plasma de los sujetos de estudio se confirmó la presencia de vesículas en la muestra mediante **A)** microscopía electrónica de transmisión tras tinción negativa (se muestran imágenes representativas de cada tipo de muestra), **B)** detección de marcadores específicos como flotillin-2, CD9 y Alix y **C)** mediante NTA se determinó el tamaño medio y la concentración de VE obtenidas.

Para comprobar la pureza de las muestras de VE y confirmar la ausencia de restos celulares en dichas muestras, se analizó mediante *western blot* la presencia de calnexina, una proteína integral del retículo endoplasmático, ausente en VE<sup>403</sup>. No se observó contenido de la proteína calnexina en las muestras de VE analizadas; sí se observó contenido de la proteína calnexina en un lisado celular utilizado como control positivo (Figura 50).

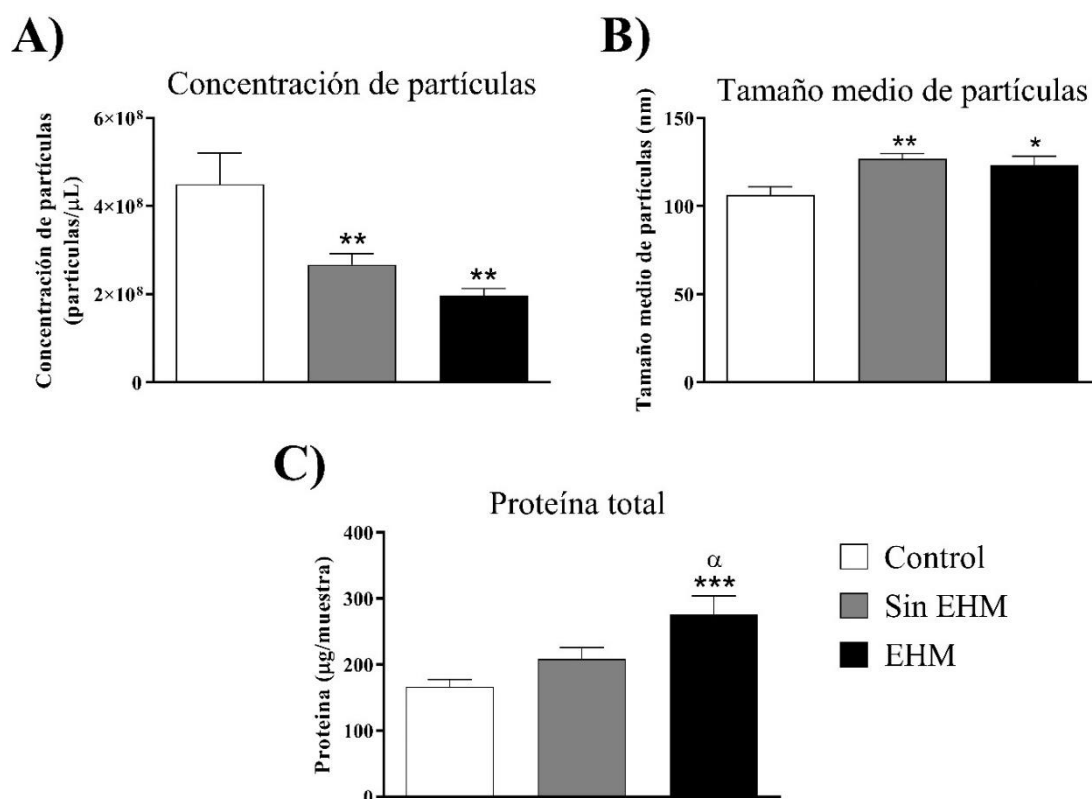


**Figura 50. Membrana representativa de *western blot* para el análisis del contenido de calnexina en muestras de VE.** No se observó presencia de calnexina en las muestras de VE aisladas de plasma de sujetos control o pacientes cirróticos sin o con EHM. Se utilizó un lisado celular como control positivo del contenido de calnexina.

## Resultados

El análisis con la tecnología NTA nos permite caracterizar la población de VE de las muestras, en concreto el tamaño medio de partículas y su concentración. Por otra parte, mediante el método BCA, determinamos la concentración de proteína en cada muestra. Las fracciones enriquecidas en VE se concentraron hasta un volumen que facilita su utilización en los posteriores estudios, pero este volumen no fue idéntico en todas las muestras, por lo que en el caso de la concentración de partículas y proteína en la muestra se realizó un cálculo para estandarizar los datos. Este cálculo consiste en multiplicar la concentración de partículas y de proteína por el volumen en  $\mu\text{L}$  de muestra una vez concentrada, de esta forma obtenemos las partículas y proteína total presente en la muestra, que se correlacionaría con las características de estas VE *in vivo*.

El NTA proporciona datos de la concentración de partículas en la muestra (en nº de partículas/ $\mu\text{L}$ ), así como del tamaño medio de las partículas presentes en la muestra (en nm). También se cuantificó la concentración de proteínas (en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en las muestras para su utilización en los estudios siguientes. El número de partículas totales en las muestras de pacientes estaba disminuido con respecto a la del grupo Control (Control  $8,4 \cdot 10^{10} \pm 1,6 \cdot 10^{10}$  partículas *vs.* Sin EHM  $4,4 \cdot 10^{10} \pm 4,9 \cdot 10^9$  partículas;  $p < 0,01$ ; *vs.* EHM  $3,3 \cdot 10^{10} \pm 4,5 \cdot 10^9$  partículas;  $p < 0,01$ ) (Figura 51A). Por el contrario, el tamaño medio de las partículas fue mayor en los grupos de pacientes con respecto al grupo Control (Control  $106,1 \pm 4,9$  nm *vs.* Sin EHM  $126,8 \pm 3,0$  nm;  $p < 0,01$ ; *vs.* EHM  $123,4 \pm 4,8$  nm;  $p < 0,05$ ) (Figura 51B). Las muestras de vesículas aisladas de plasma de pacientes con EHM presentaban un aumento en la proteína total con respecto al resto de grupos de estudio (EHM  $276,1 \pm 27,9$   $\mu\text{g}$  *vs.* Control  $166,6 \pm 11,1$   $\mu\text{g}$ ;  $p < 0,001$ ; *vs.* Sin EHM  $208,9 \pm 16,7$   $\mu\text{g}$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 51C). En resumen, en las muestras de pacientes con enfermedad hepática existía una reducción en la cantidad de vesículas, pero un aumento en su tamaño medio, además, las vesículas de los pacientes EHM contenían mayor cantidad de proteína que el resto de grupos.



**Figura 51. Caracterización de las muestras de VE aisladas a partir de plasma.** A) partículas totales por muestra (volumen total de la muestra (μL) X concentración de partículas (n° partículas/μL)), B) tamaño medio de partículas (nm) y C) proteína total por muestra (volumen total de la muestra (μL) X concentración de proteína (μg/μL)). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con α. (\* / α:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

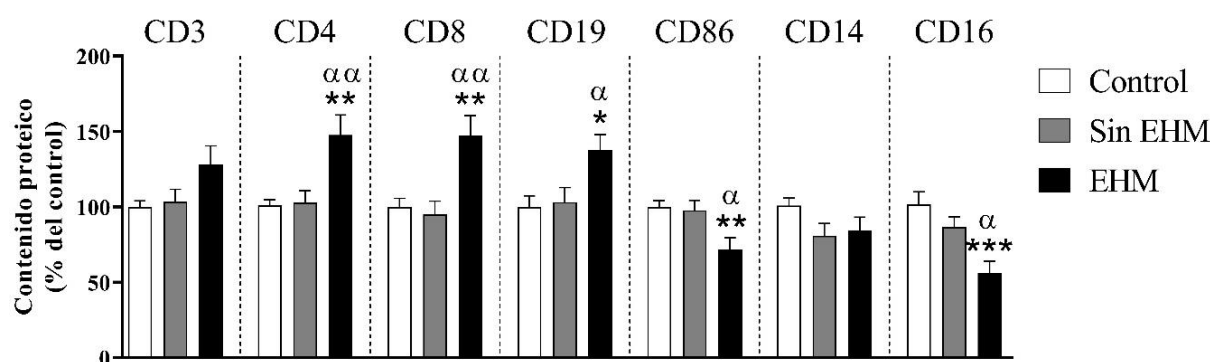
## 7.2. Análisis de marcadores específicos de origen celular

El proceso de biosíntesis de las VE por doble invaginación conlleva que las moléculas de la membrana de la célula de origen se encuentren, en la misma orientación, en dichas vesículas. Entre estas moléculas también se incluyen moléculas utilizadas como marcadores de tipos celulares específicos, como por ejemplo la molécula CD4 como marcador de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Este proceso característico de biosíntesis nos permite determinar el origen celular de las vesículas y, al cuantificar estos marcadores específicos, ver si existe un aporte diferencial de vesículas por parte de distintos tipos celulares de interés. Para ello, se cuantificó mediante *western blot* el contenido proteico de moléculas marcadoras de diferentes tipos celulares del sistema inmunitario periférico, así como marcadores de origen relativos a neuronas y microglía. Los marcadores analizados fueron: CD3 (linfocitos T), CD4 (linfocitos T CD4<sup>+</sup>), CD8 (linfocitos T CD8<sup>+</sup>), CD19 (linfocitos B), CD86 (células dendríticas), CD14 (monocitos), CD16 (monocitos pro-inflamatorios), L1CAM (neuronas) y CD13 (microglía).

## Resultados

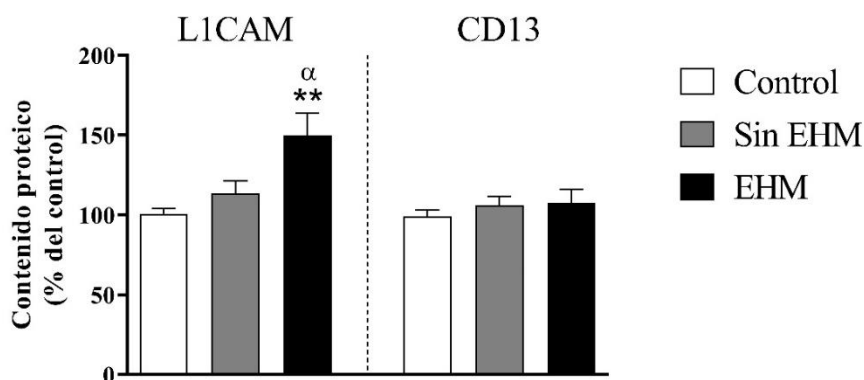
En cuanto a marcadores de linfocitos, se observó un aumento del contenido de marcadores asociados a estos tipos celulares en vesículas de pacientes con EHM. El contenido de CD3 estaba aumentado sin llegar a ser significativo (Figura 52) (Tabla 22). Se observó un aumento significativo en los marcadores CD4, CD8 y CD19 en pacientes con EHM con respecto a los grupos Control y Sin EHM (CD4: vs. Control  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,01$ ) (CD8: vs. Control  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,01$ ) (CD19: vs. Control  $p < 0,05$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (Figura 52) (Tabla 22). Otros marcadores de células inmunes analizados fueron CD86, CD14 y CD16. El contenido en CD14 tendería a disminuir en pacientes con enfermedad hepática, pero sin llegar a ser significativo (Figura 52) (Tabla 22). El contenido en CD86 y CD16 estaba disminuido significativamente en VE de pacientes con EHM (CD86: vs. Control  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (CD16: vs. Control  $p < 0,001$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (Figura 52) (Tabla 22).

**Figura 52. Contenido proteico de marcadores específicos de células inmunes en VE.** Se representa



el incremento en porcentaje del contenido proteico con respecto al control de CD3 (linfocitos T), CD4 (linfocitos T CD4<sup>+</sup>), CD8 (linfocitos T CD8<sup>+</sup>), CD19 (linfocitos B), CD86 (células dendríticas), CD14 (monocitos) y CD16 (monocitos pro-inflamatorios). Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ; (\*\*/ $\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $\alpha$ :  $p < 0,001$ ).

También se analizó el contenido en marcadores de tipos celulares asociados al SNC, como L1CAM y CD13, marcadores específicos de neurona y microglía respectivamente. El contenido en L1CAM en VE de EHM estaba aumentado (vs. Control  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ), mientras que no se observó diferencias en el contenido de CD13 (Figura 53) (Tabla 22).

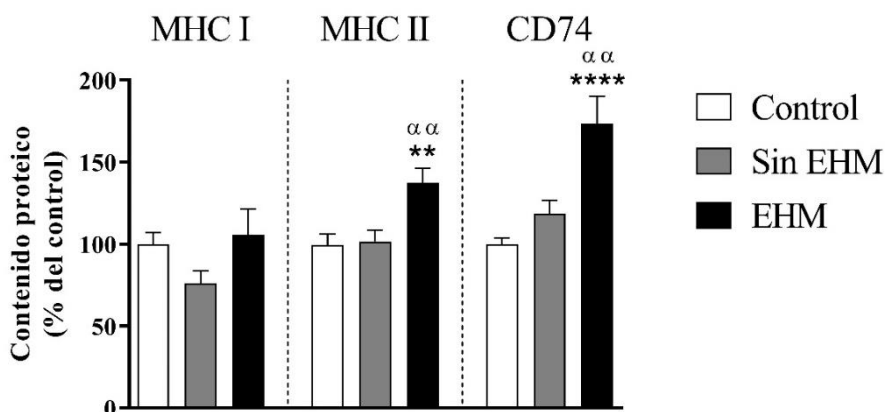


**Figura 53. Contenido proteico de marcadores específicos de células del SNC en VE.** Se representa el incremento en porcentaje del contenido proteico con respecto al control de L1CAM (neuronas) y CD13 (microglía). Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . ( $\alpha$ :  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

### 7.3. Análisis de moléculas implicadas en la presentación de antígenos

Dentro de las moléculas presentadoras de antígenos podemos encontrar el MHC I y MHC II, los cuales median la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (mediada por MHC I) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> (mediada por MHC II)<sup>404</sup>. También se cuantificó el contenido en CD74, proteína que actúa como una chaperona que facilita el tráfico intracelular del MHC II desde el retículo endoplasmático<sup>242</sup>, favoreciendo así su presencia en las VE.

El contenido en MHC I en VE no estaba alterado entre los grupos de estudio (Figura 54) (Tabla 22); en cambio, se observó un aumento significativo del contenido de MHC II y CD74 en vesículas de pacientes con EHM con respecto al resto de grupos de estudio (MHC II: vs. Control  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,01$ ) (CD74: vs. Control  $p < 0,0001$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,01$ ) (Figura 54) (Tabla 22).

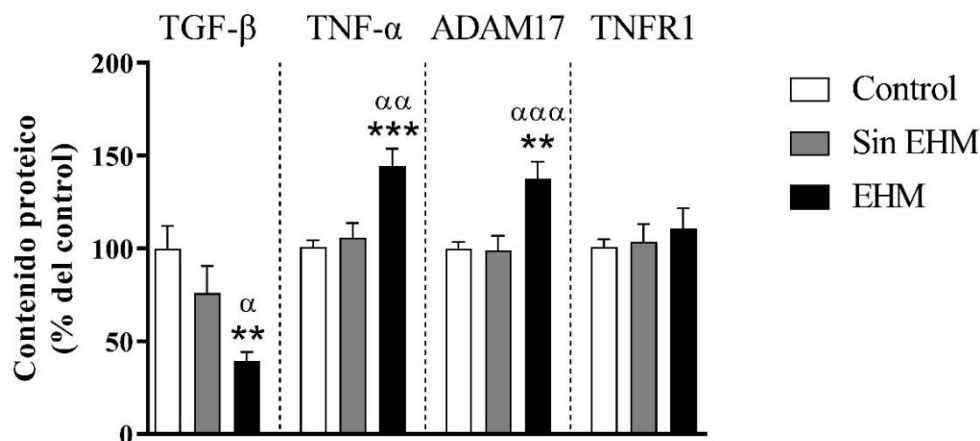


**Figura 54. Contenido proteico de MHC I, MHC II y CD74 en VE.** Se representa el incremento en porcentaje del contenido proteico con respecto al control de MHC I, MHC II y CD74. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*\*/ $\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

#### 7.4. Análisis de marcadores de inflamación en vesículas extracelulares

Se cuantificó el contenido en VE de la citocina antiinflamatoria TGF- $\beta$  y de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , así como del TNFR1 y de la metaloproteasa ADAM17 (del inglés *A Disintegrin And Metalloprotease 17*), proteína que libera el TNF- $\alpha$  unido a membrana a su forma soluble, mejorando así su función<sup>164</sup>.

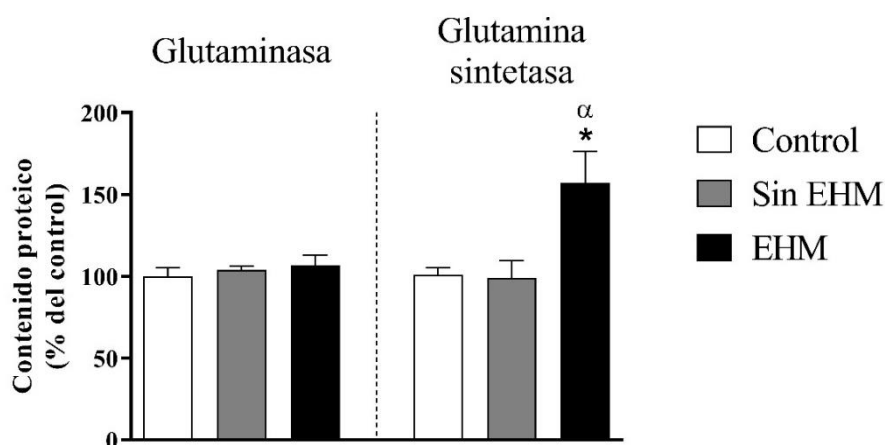
El contenido de TGF- $\beta$  en vesículas de EHM estaba disminuido (vs. Control  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ); mientras que el contenido de TNF- $\alpha$  y ADAM17 estaba aumentado (TNF- $\alpha$ : vs. Control  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (ADAM17: vs. Control  $p < 0,01$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (Figura 55) (Tabla 22). El contenido en TNFR1 no variaba entre grupos (Figura 55) (Tabla 22).



**Figura 55. Contenido proteico en marcadores de inflamación en VE.** Se representa el incremento en porcentaje del contenido proteico con respecto al control de TGF-β, TNF-α y ADAM17 y TNFR1. Los valores se representan como la media ± EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . ( $\alpha$ :  $p < 0,05$ ; \*\*/ $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$ ).

## 7.5. Análisis de enzimas implicadas en el metabolismo del amonio

Las enzimas analizadas fueron glutaminasa y glutamina sintetasa. No se encontraron diferencias en el contenido de glutaminasa en las VE en los grupos de estudio; en cambio, en VE de pacientes con EHM se observó un aumento en el contenido de glutamina sintetasa con respecto al resto de grupos (vs. Control  $p < 0,05$ ; vs. Sin EHM  $p < 0,05$ ) (Figura 56) (Tabla 22).



**Figura 56. Contenido proteico de enzimas del metabolismo del amonio en VE.** Se representa el incremento en porcentaje del contenido proteico con respecto al control de glutaminasa y glutamina sintetasa. Los valores se representan como la media ± EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con  $\alpha$ . (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ).

**Tabla 22. Contenido proteico en VE.** Marcadores de origen celular, moléculas implicadas en la presentación de antígenos, marcadores de inflamación y enzimas relacionadas con el metabolismo del amonio.

Proteína	Contenido proteico (% del control)		
	Control	Sin EHM	EHM
<b>Marcadores de origen celular</b>			
CD3 (linfocitos T)	100,0 ± 4,0	103,4 ± 8,3	128,1 ± 12,4
CD4 (linfocitos T CD4 <sup>+</sup> )	100,9 ± 3,9	102,8 ± 8,1	147,6 ± 13,3**/αα
CD8 (linfocitos T CD8 <sup>+</sup> )	100,0 ± 5,7	95,1 ± 8,7	147,1 ± 13,6**/αα
CD19 (linfocitos B)	100,0 ± 7,4	103,1 ± 9,8	138,0 ± 9,9*/α
CD86 (células dendríticas)	100,0 ± 4,1	97,6 ± 6,7	71,8 ± 7,7**/α
CD14 (monocitos)	100,9 ± 4,9	80,9 ± 8,2	84,45 ± 8,7
CD16 (monocitos pro-inflamatorios)	101,5 ± 8,6	86,5 ± 7,1	56,1 ± 7,7***/α
L1CAM (neuronas)	100,8 ± 3,4	113,6 ± 7,7	149,8 ± 13,9**/α
CD13 (microglía)	99,2 ± 4,0	105,9 ± 5,9	107,7 ± 8,2
<b>Moléculas implicadas en la presentación de antígenos</b>			
MHC I	100,0 ± 7,0	76,0 ± 7,7	105,8 ± 15,8
MHC II	99,6 ± 6,6	101,6 ± 6,8	137,5 ± 8,7**/αα
CD74	100,0 ± 3,6	118,6 ± 8,2	173,7 ± 16,5****/αα
<b>Marcadores de inflamación</b>			
TGF- β	100,0 ± 12,1	76,1 ± 14,4	39,3 ± 4,9**/α
TNF-α	100,7 ± 3,9	105,9 ± 7,9	144,2 ± 9,5***/αα
TNRF1	100,8 ± 4,2	103,8 ± 9,4	110,8 ± 10,8
ADAM17	100,2 ± 3,3	99,1 ± 7,7	137,7 ± 8,9**/αα
<b>Enzimas implicadas en el metabolismo del amonio</b>			
Glutaminasa	100,1 ± 5,3	110,1 ± 6,8	113,3 ± 6,5
Glutamina sintetasa	100,8 ± 4,4	99,2 ± 10,4	157,0 ± 19,4*/α

Los valores se presentan como la media ± EEM del incremento en porcentaje del contenido proteico con respecto al grupo control. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con α. (\*/α:  $p < 0,05$ ; (\*\*/αα:  $p < 0,01$ ; (\*\*\*/ααα:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*/ααα:  $p < 0,0001$ ).

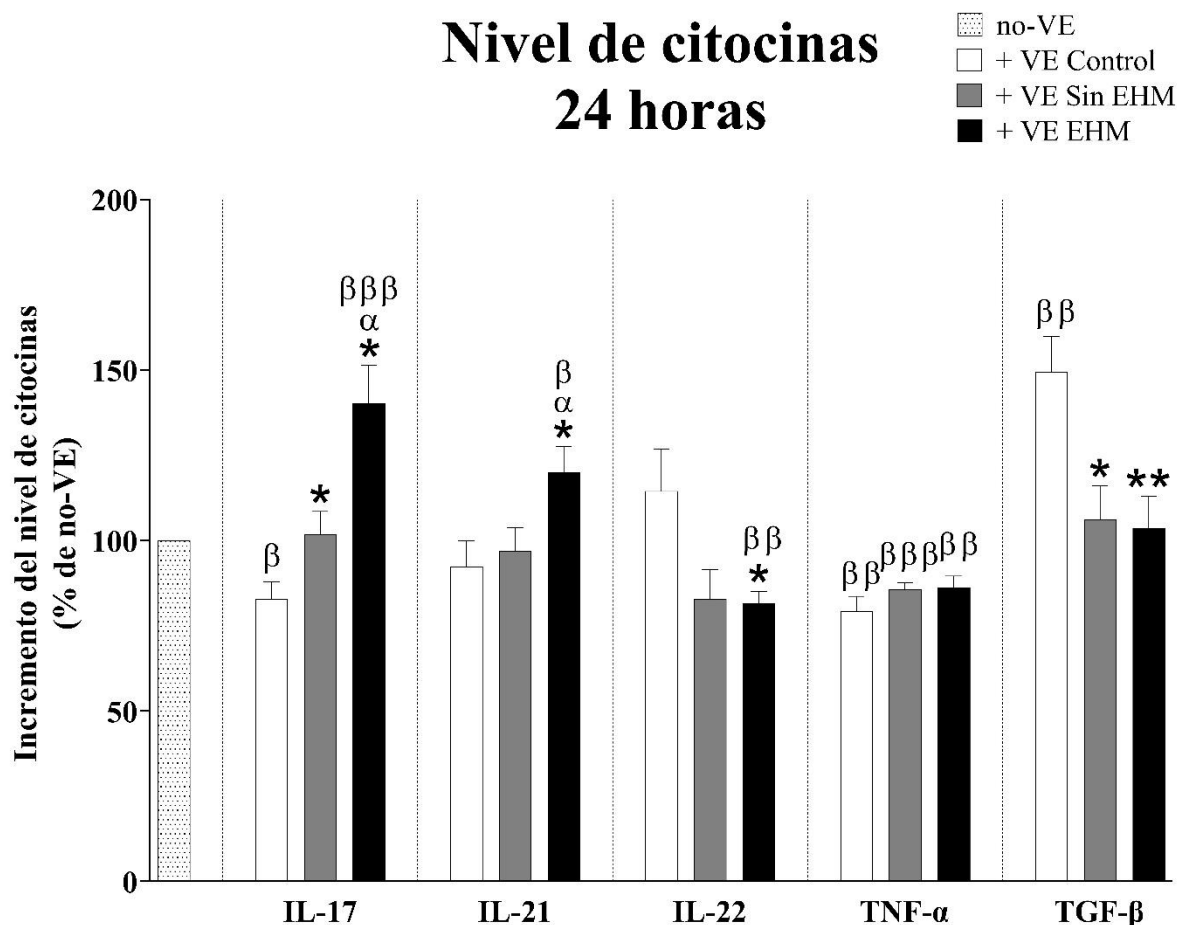
## 8. Estudio del efecto *in vitro* de vesículas extracelulares sobre cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Estudiamos el efecto de las VE de pacientes con EHM sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sujetos control para evaluar la capacidad de estas vesículas para modular la expresión de citocinas e inducir la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, así como relacionar estos cambios con las alteraciones en el sistema inmunitario observadas *in vivo* en pacientes con EHM. Se realizaron cultivos celulares de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de VE de los tres grupos de estudio (Control, Sin EHM y EHM), además de mantener otra condición sin vesículas, solo con adición de PBS como referencia (condición No-VE). A las 24 horas del cultivo se cuantificaron los niveles de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el medio para evaluar el papel de las vesículas en la modulación de la síntesis y liberación de estas citocinas. A los 5 días de



cultivo se cuantificó la expresión génica de factores de transcripción específicos de varias subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y las citocinas en el medio para estudiar el efecto de las vesículas sobre la diferenciación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y la modulación en la síntesis y liberación de citocinas a largo plazo.

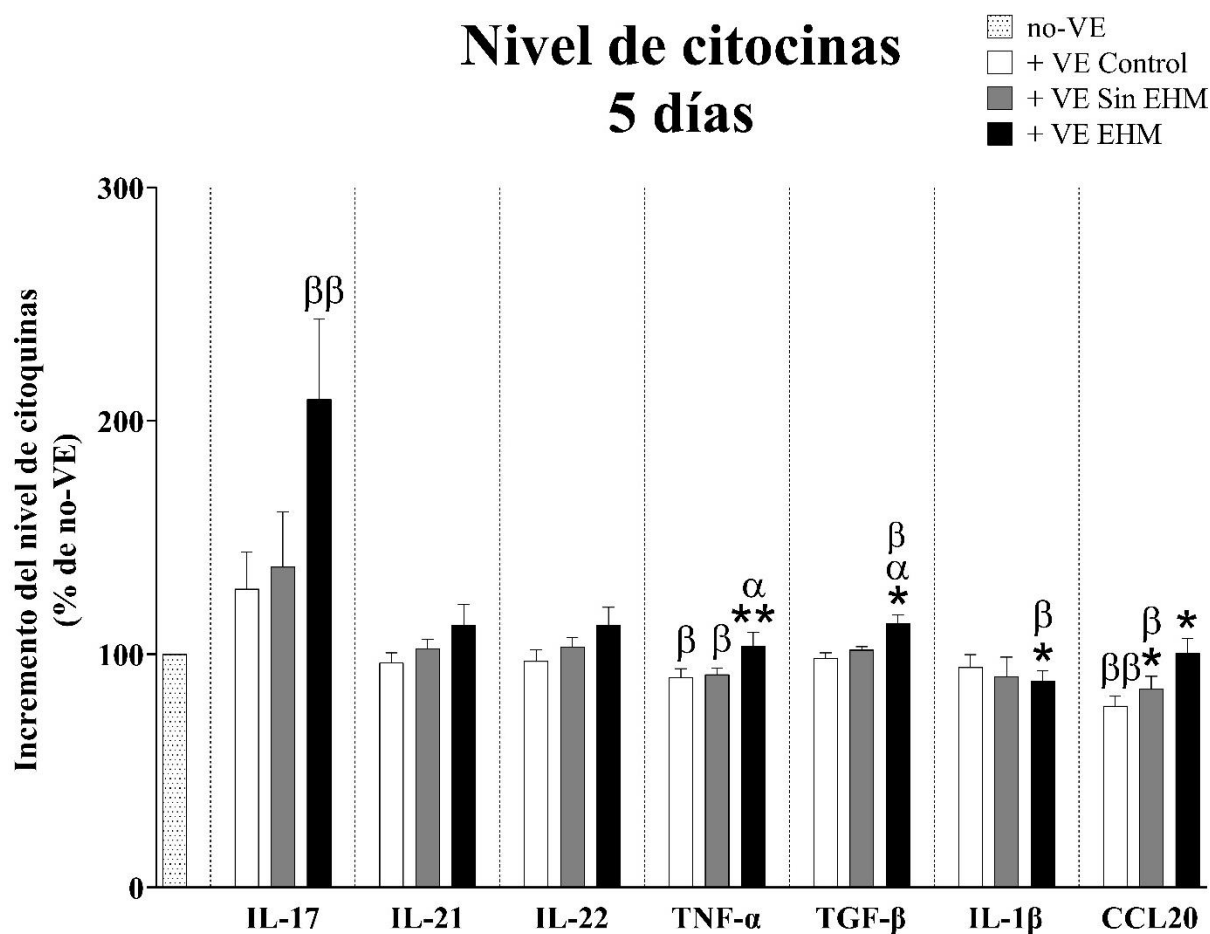
A las 24 horas de cultivo, las células cultivadas con VE de EHM inducían un aumento significativo en el medio de las citocinas IL-17 e IL-21 ( $140 \pm 11 \%$  y  $120 \pm 8 \%$  respectivamente) en comparación con la condición sin adición de VE (IL-17:  $p < 0,001$ ; IL-21:  $p < 0,05$ ), o con la adición de VE de controles ( $p < 0,05$  para ambas ILs) o de pacientes sin EHM ( $p < 0,05$  para ambas ILs) (Figura 57) (Tabla 23). Las células cultivadas en presencia de VE de EHM presentaban una disminución en los niveles de IL-22 en el medio a 24 horas ( $82 \pm 5 \%$ ) con respecto a la condición sin VE ( $p < 0,01$ ) y la condición en presencia de VE de sujetos control ( $p < 0,05$ ) (Figura 57) (Tabla 23). El cultivo de células en presencia VE de sujetos control disminuyó la liberación de IL-17 ( $83 \pm 5 \%$ ;  $p < 0,05$ ) y aumentó la de TGF- $\beta$  ( $150 \pm 10 \%$ ;  $p < 0,01$ ) con respecto a la condición sin VE (Figura 57) (Tabla 23). En comparación con la condición en presencia de VE de sujetos control, las VE de pacientes sin y con EHM inducían una mayor liberación de IL-17 al medio de cultivo, y una menor liberación de TGF- $\beta$  (Figura 57) (Tabla 23). Los cultivos incubados en presencia de VE de todos los grupos de estudio redujeron el nivel de TNF- $\alpha$  presente en el medio en comparación a la condición de referencia ( $p < 0,01$  vs. + VE Control;  $p < 0,001$  vs. + VE Sin EHM;  $p < 0,01$  vs. + VE EHM) (Figura 57) (Tabla 23).



**Figura 57. Nivel de citocinas a 24 horas en el medio de cultivo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> incubados en presencia de VE.** Los niveles de citocinas se expresan como incremento, en porcentaje, del nivel de expresión de la condición de referencia (condición sin VE (No-VE)). Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de controles (+ VE Control) se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de pacientes sin EHM (+ VE Sin EHM) se representan con  $\alpha$ . Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación sin VE (No-VE) se representan con  $\beta$ . (\*/ $\alpha$ / $\beta$ :  $p < 0,05$ ; \*\*/ $\beta\beta$ :  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$ :  $p < 0,001$ ).

A los 5 días de cultivo los niveles de IL-17 se mantuvieron altos en el medio de células cultivadas en presencia de VE de EHM ( $209 \pm 34$  %;  $p < 0,01$ ), mientras que no se observaron diferencias en los niveles de IL-21 e IL-22 del medio entre las condiciones estudiadas (Figura 58) (Tabla 23). A los 5 días también se observó un incremento en los niveles de TGF- $\beta$  en cultivos de células incubadas con VE de EHM con respecto a la condición sin VE ( $p < 0,05$ ), la adición de VE de controles ( $p < 0,05$ ) y de pacientes sin EHM ( $p < 0,05$ ) (Figura 58) (Tabla 23). Los niveles de IL-1 $\beta$  se redujeron en cultivos celulares en presencia de VE de EHM en comparación con la condición de referencia ( $p < 0,05$ ) y cultivos tratados con vesículas de Control ( $p < 0,05$ ) (Figura 58) (Tabla 23). Los niveles de TNF- $\alpha$  y CCL20 en el medio de cultivo de 5 días se redujeron en las condiciones incubadas con VE de Control y Sin EHM en

comparación con la condición de referencia (TNF- $\alpha$ : vs. + VE Control  $p<0,05$ ; vs. + VE Sin EHM  $p<0,05$ ) (CCL20: vs. + VE Control  $p<0,01$ ; vs. + VE Sin EHM  $p<0,05$ ) (Figura 58) (Tabla 23). Los niveles TNF- $\alpha$  y CCL20 en el medio de 5 días se mantuvo en los cultivos incubados en presencia de vesículas de EHM con respecto a la condición de referencia, siendo sus niveles significativamente mayores con respecto a los cultivos incubados con VE de Control (TNF- $\alpha$ :  $p<0,01$ ; CCL20:  $p<0,05$ ) y de pacientes sin EHM (TNF- $\alpha$ :  $p<0,05$ ) (Figura 58) (Tabla 23).



**Figura 58. Nivel de citocinas a 5 días en el medio de cultivo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sujetos control incubados en presencia de VE.** Los niveles de citocinas se expresan como incremento, en porcentaje, del nivel de expresión de la condición de referencia (condición sin VE (No-VE)) para cada experimento independiente. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de controles (+ VE Control) se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de pacientes sin EHM (+ VE Sin EHM) se representan con  $\alpha$ . Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación sin VE (No-VE) se representan con  $\beta$ . (\*/ $\alpha$ / $\beta$ :  $p<0,05$ ; \*\*/ $\beta\beta$ :  $p<0,01$ ).

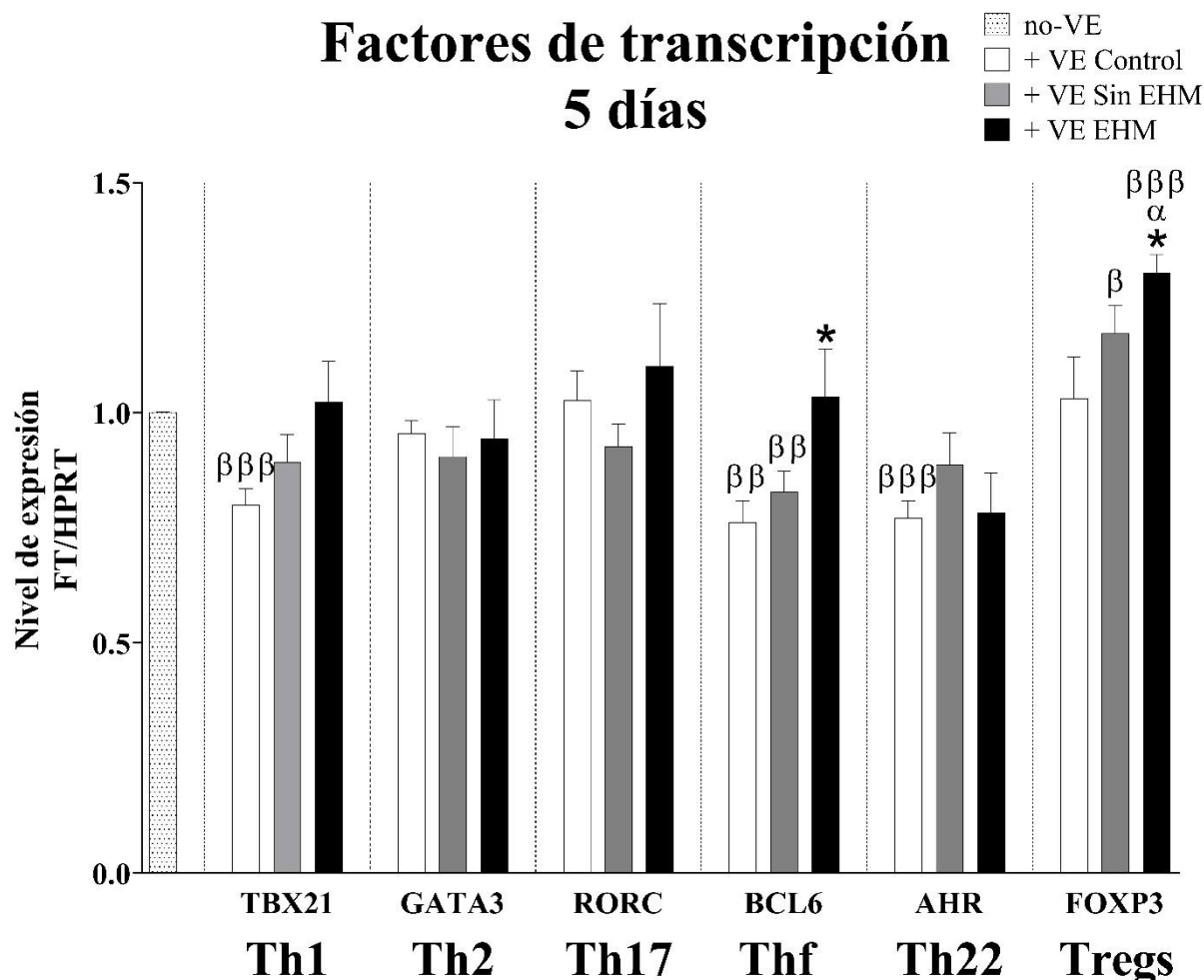
**Tabla 23. Nivel de citocinas a 24 horas y 5 días en el medio de cultivo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sujetos control incubados en presencia de VE.**

Citocina	Nivel de expresión (% con respecto a No-VE)		
	+ VE Control	+ VE Sin EHM	+ VE EHM
<b>Nivel de citocinas a 24 horas</b>			
IL-17	82,9 ± 5,1 <sup>β</sup>	101,9 ± 6,7*	140,2 ± 11,2*/α/βββ
IL-21	92,3 ± 7,6	97,0 ± 6,8	119,9 ± 7,6*/α/β
IL-22	114,5 ± 12,3	82,8 ± 8,6	81,6 ± 4,5*/β
TNF-α	79,3 ± 4,4 <sup>ββ</sup>	85,7 ± 1,9 <sup>βββ</sup>	86,3 ± 3,2 <sup>ββ</sup>
TGF-β	149,5 ± 10,3 <sup>ββ</sup>	106,1 ± 9,9*	103,6 ± 9,3**
<b>Nivel de citocinas a 5 días</b>			
IL-17	128,1 ± 15,6	137,5 ± 23,4	209,4 ± 34,2 <sup>ββ</sup>
IL-21	96,3 ± 4,3	102,4 ± 4,1	112,4 ± 8,9
IL-22	97,0 ± 4,9	103,2 ± 3,8	112,6 ± 7,5
TNF-α	90,1 ± 3,6 <sup>β</sup>	91,3 ± 2,7 <sup>β</sup>	103,5 ± 5,8***/α
TGF-β	98,2 ± 2,4	101,8 ± 1,4	113,2 ± 3,7*/α/β
IL-1β	94,4 ± 5,4	90,5 ± 8,3	88,6 ± 4,3*/β
CCL20	77,9 ± 4,3 <sup>ββ</sup>	85,3 ± 5,2*/β	100,6 ± 6,2*

Los niveles de citocinas se expresan como incremento, en porcentaje, del nivel de expresión de la condición de referencia (condición sin VE (No-VE)) para cada experimento independiente. Los valores se representan como la media ± EEM. Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de controles (+ VE Control) se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de pacientes sin EHM (+ VE Sin EHM) se representan con α. Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación sin VE (No-VE) se representan con β. (\* /α/β:  $p < 0,05$ ; \*\* /ββ:  $p < 0,01$ ; βββ:  $p < 0,001$ ).

Para estudiar la capacidad de las VE para inducir la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se analizó mediante RT-qPCR la expresión de los factores de transcripción TBX21, GATA3, RORC, BCL6, AHR y FOXP3, factores específicos de los subtipos de linfocitos Th1, Th2, Th17, Thf, Th22 y Tregs, respectivamente. La presencia de VE de sujetos control redujo significativamente la expresión de los factores de transcripción TBX21 ( $p < 0,001$ ) y AHR ( $p < 0,01$ ) en comparación con las células cultivadas sin VE (Figura 59) (Tabla 24), mientras que esta expresión no se vio afectada con la presencia de VE de pacientes sin o con EHM. En cultivos incubados con VE de sujetos control o de pacientes Sin EHM la expresión de BCL6 estaba significativamente reducida en comparación con la condición sin VE ( $p < 0,01$  vs. + VE Control;  $p < 0,01$  vs. + VE Sin EHM) (Figura 59) (Tabla 24). La expresión de BCL6 en presencia de VE de pacientes con EHM se mantuvo con respecto a la condición sin VE, llegando a ser significativa la diferencia en nivel de expresión comparado con la condición tratada con vesículas Control ( $p < 0,05$ ) (Figura 59) (Tabla 24). En cuanto a la expresión de FOXP3, se observó un incremento significativo en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cultivados con VE de pacientes con EHM con respecto a la condición de referencia ( $p < 0,001$ ), a la adición de VE Control ( $p < 0,05$ ) y a la adición de VE Sin EHM ( $p < 0,05$ ). Las VE de pacientes Sin EHM también

inducían un aumento en la expresión de FOXP3 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en comparación con la condición de referencia ( $p < 0,05$ ) (Figura 59) (Tabla 24). La expresión en GATA3 y RORC no estaba alterada con ninguna de las condiciones estudiadas (Figura 59) (Tabla 24).



**Figura 59.** Nivel de expresión de factores de transcripción en cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sujetos control incubados en presencia de VE. Los niveles de expresión se normalizan mediante un gen endógeno (HPRT1) y se expresan en relación al nivel de expresión de la condición de referencia (condición sin VE (No-VE)) para cada experimento independiente, que se considera 1. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de controles (+ VE Control) se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de pacientes sin EHM (+ VE Sin EHM) se representan con  $\alpha$ . Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación sin VE (No-VE) se representan con  $\beta$ . (\*/ $\alpha$ / $\beta$ :  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$ :  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$ :  $p < 0,001$ ).

**Tabla 24. Nivel de expresión de factores de transcripción en cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sujetos control en presencia de VE.**

Factor de transcripción	Nivel de expresión FT/HPRT1		
	+ VE Control	+ VE Sin EHM	+ VE EHM
TBX21 (Th1)	0,80 ± 0,03 <sup>βββ</sup>	0,89 ± 0,06	1,02 ± 0,09
GATA3 (Th2)	0,96 ± 0,03	0,91 ± 0,07	0,95 ± 0,08
RORC (Th17)	1,03 ± 0,06	0,93 ± 0,05	1,10 ± 0,14
BCL6 (Thf)	0,76 ± 0,05 <sup>ββ</sup>	0,83 ± 0,05 <sup>ββ</sup>	1,04 ± 0,10*
AHR (Th22)	0,77 ± 0,00 <sup>βββ</sup>	0,88 ± 0,07	0,78 ± 0,09
FOXP3 (Tregs)	1,03 ± 0,09	1,17 ± 0,04 <sup>β</sup>	1,31 ± 0,04 <sup>*/α/βββ</sup>

Los niveles de expresión se normalizan mediante un gen endógeno (HPRT1) y se expresan en relación al nivel de expresión de la condición de referencia (condición sin VE (No-VE)) para cada experimento independiente, que se considera 1. Los valores se representan como la media ± EEM. Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de controles (+ VE Control) se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación con VE de pacientes sin EHM (+ VE Sin EHM) se representan con  $\alpha$ . Las diferencias estadísticas con respecto a la condición de incubación sin VE (No-VE) se representan con  $\beta$ . (\*/ $\alpha$ / $\beta$ :  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$ :  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$ :  $p < 0,001$ ).

## 9. Análisis de correlación entre alteraciones cognitivas y motoras y parámetros inmunológicos estudiados y su capacidad predictiva

Con los análisis de correlación bivariada el objetivo es determinar si dos variables tienen relación entre sí, si esta relación es robusta y en qué dirección están relacionadas, es decir, si las dos aumentan, si disminuyen o evolucionan de forma opuesta. Este análisis sólo indica una relación entre las variables, no causalidad necesariamente. Un nivel de significancia  $p < 0,05$  del coeficiente de correlación nos indica que existe correlación entre las variables, mientras que el valor del coeficiente de correlación nos permite conocer la robustez y la dirección de esta relación. Coeficientes de correlación positivos indican que las variables evolucionan en la misma dirección, es decir, las dos aumentan o las dos disminuyen, mientras, coeficientes negativos indican que las variables evolucionan en direcciones opuestas, cuando una aumenta la otra disminuye y viceversa. El valor del coeficiente nos proporciona información acerca de la robustez; valores más cercanos a -1 o +1 indican una relación más fuerte.

### 9.1. Correlación entre parámetros inmunológicos estudiados y alteraciones cognitivas y motoras

Para este estudio realizó un análisis de correlaciones bivariadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson para variables continuas entre los parámetros inmunológicos estudiados y los resultados obtenidos en los test psicométricos en los pacientes con enfermedad hepática.

### 9.1.1. Correlaciones con niveles de amonio en sangre

En la Tabla 25 se muestran las correlaciones entre la concentración amonio con los resultados de los test psicométricos realizados.

Se obtuvieron correlaciones negativas entre los niveles de amonio en sangre y parámetros que evalúan la velocidad de procesamiento y atención selectiva (test oral de claves), flexibilidad cognitiva e inhibición mental (test Stroop), concentración selectiva-sostenida y concentración (test d2) y memoria de trabajo (test oral de dígitos y test oral de letras y número) (Tabla 25). Por otra parte, se obtuvo una correlación positiva entre los niveles de amonio en sangre y los resultados obtenidos en los test de coordinación motora (test de coordinación bimanual y visuo-motora) (Tabla 25).

**Tabla 25. Correlaciones bivariadas de los niveles de amonio con los resultados de los test psicométricos realizados.**

Parámetro	Amonio
<b>PHES</b>	-0,319**
<b>Test oral de claves</b>	
Total	-0,412**
Aciertos	-0,375**
<b>Test Stroop</b>	
Tarea congruente	-0,273**
Tarea neutra	-0,181*
Tarea incongruente	-0,179*
<b>Test d2</b>	
TR	-0,263**
TA	-0,244**
C	-0,252**
TOT	-0,254**
CON	-0,228**
<b>Test oral de dígitos</b>	
Aciertos	-0,181*
<b>Test oral de letras y números</b>	
Aciertos	-0,187*
<b>Coordinación motora</b>	
Bimanual	0,249**
Visuo-motora	0,273**

TR: total respuestas; TA: total aciertos; C: errores por comisión; TOT: índice de efectividad; CON: índice de concentración. Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson, con excepción del PHES, en el que se muestra el coeficiente de correlación de Spearman. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

### **9.1.2. Correlaciones con las poblaciones de linfocitos B y niveles de mediadores relacionados**

En las Tablas 26 y 27 se muestran las correlaciones entre las poblaciones de linfocitos B y mediadores relacionados con los resultados de los test psicométricos realizados.

La puntuación PHES correlacionó negativamente con el porcentaje de linfocitos B totales y B naïve, mientras que se obtuvo una correlación positiva con el porcentaje de linfocitos B de memoria, B de memoria *unswitched* (Tabla 26).

Se obtuvieron correlaciones negativas entre el porcentaje de linfocitos B totales con los parámetros que evalúan la velocidad de procesamiento y atención selectiva (test oral de claves), flexibilidad cognitiva e inhibición mental (test Stroop) y concentración selectiva-sostenida y concentración (test d2) (Tabla 26). Por otra parte, se obtuvo una correlación positiva entre el porcentaje de linfocitos B totales con los resultados obtenidos en los test de coordinación motora (test de coordinación bimanual y visuo-motora) (Tabla 26), así como entre la activación de los linfocitos B totales y linfocitos B naïve con parámetros relativos a la flexibilidad cognitiva e inhibición mental del test Stroop (Tabla 26). El parámetro TOT, que se relaciona con la concentración, correlacionó positivamente con el porcentaje de linfocitos B naïve y negativamente con el porcentaje de linfocitos B de memoria y sus subtipos (Tabla 26). Asimismo, niveles mayores de activación de los diferentes subtipos de linfocitos B se correlacionaron con una peor ejecución en el test d2, como indican las correlaciones negativas encontradas (Tabla 26).

Los niveles de BAFF e IgA en plasma correlacionaron negativamente con la puntuación PHES y los parámetros que evalúan la flexibilidad cognitiva e inhibición mental (test Stroop) y concentración selectiva-sostenida y concentración (test d2) (Tabla 27), además, los niveles de IgA también correlacionaron negativamente con velocidad de procesamiento y atención selectiva evaluadas por el test oral de claves y positivamente con la coordinación motora evaluada mediante los test de coordinación bimanual y visuo-motora (Tabla 27).



Tabla 26. Correlaciones bivariadas entre las poblaciones de linfocitos B y los resultados de los test psicométricos realizados.

Parámetro	Población (%)						Recuento (células/ $\mu$ L)						
	Linfocitos B	Plasmoblastos	B maduros	B naïve	B memoria	B unswitched	B switched	Linfocitos B	Plasmoblastos	B maduros	B de memoria	B switched	B DN
<b>PHES</b>	-0,436**			-0,279*	0,352**	0,320*							
<b>Test oral de claves</b>													
Total	-0,342*		0,281*				0,356*					0,287*	
Aciertos	-0,359*						0,360**						
<b>Test Stroop</b>													
Tarea congruente	-0,349*							-0,332*	-0,364*	-0,329*	-0,302*		
Tarea neutra	-0,331*												
<b>Test d2</b>													
TR	-0,377**			-0,364*	0,367*	0,372*	0,429**				0,299*	0,317*	
TA	-0,449**						0,437**						
O				0,304*	-0,334*		-0,398**				-0,315*	-0,381*	
TOT	-0,430**			-0,322*	0,311*		0,401**					0,304*	
CON	-0,385**						0,332*					0,309*	
<b>Test oral de letras y números</b>													
Aciertos												0,312*	0,326*
<b>Test de coordinación motora</b>													
Bimanual	0,275*	0,311*	-0,312*							0,427**			
Visuo-motora	0,299*		-0,328*				-0,295*						

TR: total respuestas; TA: total aciertos; O: errores por omisión; TOT: índice de efectividad; CON: índice de concentración. Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson, con excepción del PHES, en el que se muestra el coeficiente de correlación de Spearman. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

**Tabla 27. Correlaciones bivariadas entre la activación de las poblaciones de linfocitos B y sus mediadores con los resultados de los test psicométricos realizados.**

Parámetro	Proteínas en plasma			
	BAFF	APRIL	BDNF	IgA
<b>PHES</b>	-0,363**			-0,485**
<b>Test oral de claves</b>				
Total				-0,449**
Aciertos				-0,453**
<b>Test Stroop</b>				
Tarea congruente	-0,286*			-0,389**
Tarea neutra				-0,398**
Tarea incongruente	-0,285*			-0,333**
<b>Test d2</b>				
TR	-0,331**		0,375**	-0,324**
TA	-0,259*		0,256*	-0,342**
O	0,251*	-0,415**	-0,414**	
C	-0,308*			
TOT	-0,254*		0,328**	-0,315*
CON	-0,270*			-0,310*
<b>Test de coordinación motora</b>				
Bimanual				0,262*
Visuo-motora				0,429**

TR: total respuestas; TA: total aciertos; O: errores por omisión; C: errores por comisión; TOT: índice de efectividad; CON: índice de concentración. Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson, con excepción del PHES, en el que se muestra el coeficiente de correlación de Spearman. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

### 9.1.3. Correlaciones con las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y niveles de IL-17 en plasma

En la Tabla 27 se muestran las correlaciones entre las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> e IL-17 en plasma con los resultados de los test psicométricos realizados.

La puntuación PHES correlacionó negativamente la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales y los niveles en sangre de IL-17, mientras que se obtuvo una correlación positiva con el porcentaje de linfocitos Th1 y el cociente Th1/Th2 (Tabla 28).

Se obtuvieron correlaciones negativas entre la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los parámetros que evalúan la flexibilidad cognitiva y atención selectiva (test Stroop) y la memoria de trabajo (test oral de letras y números) (Tabla 28). Se encontraron correlaciones positivas entre los

linfocitos Th1 y la velocidad de procesamiento y atención selectiva (test oral de claves) (Tabla 28). El resultado del test oral de letras y números, que se relaciona con la memoria de trabajo, correlacionó negativamente con el porcentaje de linfocitos Th17 y la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, Th1, Thf y Th9 (Tabla 28). La población de linfocitos Th9 y la activación de Th2 correlacionó positivamente con los resultados de los test de coordinación bimanual y visuo-motora, respectivamente (Tabla 28). Por último, los niveles de IL-17 en sangre presentaron una correlación negativa con parámetros relacionados con la atención selectiva-sostenida (TA y TOT) y concentración (CON) (test d2) (Tabla 28).

Resultados

**Tabla 28. Correlaciones bivariadas entre las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> e IL-17 con los resultados de los test psicométricos realizados.**

Parámetro	Población (%)				Cociente Th1/Th2	Recuento (células/ $\mu$ L)	Activación (% CD69 <sup>+</sup> )					Proteínas en plasma	
	Th1	Th2	Th17	Th9		Th1	Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	Th1	Th2	Thf	Th9	Tregs	IL-17
<b>PHES</b>	0,463*				0,401*		-0,396*						-0,226**
<b>Test oral de claves</b>													
Total	0,473*					0,445*							
Aciertos	0,446*					0,442*							
Errores								0,362*			0,374*		
<b>Test Stroop</b>													
Tarea congruente						0,522*		0,431*					
Tarea neutra						0,476*	-0,406*	-0,386*			-0,388*		
Tarea incongruente							-0,376*						
<b>Test d2</b>													
TA										-0,511*			-0,232**
C		-0,553*										-0,491*	
TOT													-0,209*
CON		-0,541*								-0,515*			-0,230**
<b>Test oral de dígitos</b>													
Aciertos directos										-0,654*			
<b>Test oral de letras y números</b>													
Aciertos			-0,695*				-0,721*	-0,622*		-0,727*	-0,679*		
<b>Test de coordinación motora</b>													
Bimanual				0,366*									
Visuo-motora										0,372*			

TA: total aciertos; C: errores por comisión; TOT: índice de efectividad; CON: índice de concentración. Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson, con excepción del PHES, en el que se muestra el coeficiente de correlación de Spearman. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

#### **9.1.4. Correlaciones con la expresión génica y contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

En la Tabla 29 se muestran las correlaciones entre la expresión génica y el contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup> con los resultados de los test psicométricos realizados.

La puntuación PHES correlacionó negativamente con la expresión génica de la IL-17 y el contenido proteico de la IL-1 $\beta$ , mientras que se obtuvo una correlación positiva con el contenido de TTP en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Tabla 29).

La expresión del mensajero de IL-17 correlacionó negativamente con el índice de atención selectiva-sostenida (TOT) del test d2 y positivamente con los resultados de los test de coordinación motora (Tabla 29). El contenido de TTP correlacionó con parámetros que evalúan la velocidad de procesamiento y atención selectiva (test oral de claves y parámetro TA del test d2), la atención selectiva-sostenida y concentración (test d2) y la coordinación motora (test de coordinación visuo-motora) (Tabla 29). El contenido de A20 y TNF- $\alpha$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> correlacionó positivamente con la memoria de trabajo evaluada mediante el test oral de dígitos (Tabla 29).

Resultados

**Tabla 29. Correlaciones bivariadas entre la expresión génica y el contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup> con los resultados de los test psicométricos realizados.**

Parámetro	ARNm en Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>			Proteína en Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>				
	IL-1β	IL-17	TLR4	A20	TTP	TNF-α	IL-1β	Glutaminasa
<b>PHES</b>		-713**			0,442*		-0,483*	
<b>Test oral de claves</b>								
Total			-0,509*	0,457*	0,616**			
Aciertos			-0,507*	0,468*	0,615**			
Errores	-0,526*	0,614*						-0,444*
<b>Test Stroop</b>								
Tarea congruente					0,586**		-0,555**	
Tarea neutra	0,620**				0,541*		-0,447*	
<b>Test d2</b>								
TA		-0,715*			0,624**			
TOT		-0,711*			0,597*			
CON					0,552*			
<b>Test oral de dígitos</b>								
Aciertos inversos				0,413*		0,429*		
<b>Test de coordinación motora</b>								
Bimanual		0,761**						
Visuo-motora		0,578*	0,704**		-0,600**			

TA: total aciertos; TOT: índice de efectividad; CON: índice de concentración. Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson, con excepción del PHES, en el que se muestra el coeficiente de correlación de Spearman. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

### **9.1.5. Correlaciones con el contenido proteico en vesículas extracelulares**

En la Tabla 30 se muestran las correlaciones entre el contenido proteico de VE con los resultados de los test psicométricos realizados.

La puntuación PHES correlacionó negativamente con el contenido proteico en VE de marcadores de linfocitos T citotóxicos (CD8), linfocitos B (CD19) y neuronas (L1CAM), así como con el contenido de MHCII, CD74, TNF- $\alpha$  y ADAM17 (Tabla 30). También se encontraron correlaciones positivas con el contenido del marcador de células dendríticas (CD86) y con la molécula anti-inflamatoria TGF- $\beta$  (Tabla 30).

El contenido de CD8 y CD86 en VE correlacionó negativa y positivamente, respectivamente, con parámetros que evalúan la velocidad de procesamiento y atención selectiva y flexibilidad cognitiva e inhibición mental, mientras que presentaron una correlación inversa con la coordinación motora (Tabla 30). El contenido de CD4 correlacionó negativamente con la velocidad de procesamiento (total de ítems del test oral de claves y resultados de la tarea congruente del test Stroop), y negativamente con la coordinación motora evaluada por el test de coordinación motora (Tabla 30). El contenido en moléculas implicadas en la activación del sistema inmunitario, como MHC II y CD74, correlacionó negativamente con parámetros que evalúan la velocidad de procesamiento y la flexibilidad cognitiva e inhibición mental; y presentaron una correlación positiva con la coordinación motora evaluada mediante el test de coordinación visuo-motor (Tabla 30).

Resultados

**Tabla 30. Correlaciones bivariadas entre el contenido proteico de VE con los resultados de los test psicométricos realizados.**

Parámetro	Marcadores específicos de origen celular							Moléculas implicadas en la presentación de antígenos			Marcadores de inflamación			
	CD3	CD4	CD8	CD19	CD86	CD14	LICAM	MHC I	MHC II	CD74	TGF- $\beta$	TNF- $\alpha$	ADAM17	TNFR1
<b>PHES</b>			-0,485**	-0,353*	0,425**		-0,253*		-0,280*	-0,450**	0,297*	-0,419**	-0,280*	
<b>Test oral de claves</b>														
Total		-0,284*	-0,323*		0,341*				-0,286*					-0,339**
Aciertos					0,314*									-0,299*
Errores						-0,357**							-0,285*	
<b>Test Stroop</b>														
Tarea congruente		-0,327*	-0,351*						-0,298*	-0,300*				-0,343*
Tarea neutra		-0,306*	-0,406**		0,344*				-0,299*	-0,375**				-0,283*
Tarea incongruente			-0,410**		0,411**				-0,315*					
<b>Test d2</b>														
TR														-0,290*
TA					0,356*									
O										0,358*				
CON					0,345*									
<b>Test oral de dígitos</b>														
Aciertos directos				-0,359*					-0,400**		0,302*			
<b>Test oral de letras y números</b>														
Aciertos	-0,310*													
<b>Test de coordinación motora</b>														
Bimanual		0,278*	0,306*		-0,339*									
Visuo-motora	0,320*		0,491**		-0,368*			0,435**	0,346*	0,416**	0,375**	-0,408**		

TR: total respuestas; TA: total aciertos; O: errores por omisión; CON: índice de concentración. Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson, con excepción del PHES, en el que se muestra el coeficiente de correlación de Spearman. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).



## 9.2. Correlación entre parámetros inmunológicos estudiados

Para este estudio se realizó un análisis de correlaciones bivariadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson para variables continuas entre los parámetros inmunológicos estudiados.

### 9.2.1. Correlaciones entre parámetros del inmunofenotipo B y el inmunofenotipo T y contenido proteico en vesículas extracelulares

En las Tablas 31 y 32 se muestran las correlaciones entre el porcentaje, recuento y activación de poblaciones de linfocitos B con parámetros del inmunofenotipo de linfocitos T.

Se obtuvo una correlación positiva entre el nivel de activación de los linfocitos B con el porcentaje poblacional de los linfocitos Th2 y con el nivel de activación de los linfocitos Tregs (Tabla 31). El recuento de linfocitos B totales correlacionó negativamente con los porcentajes en sangre de linfocitos Th22 y Th17 (Tabla 31). El porcentaje de linfocitos B inmaduros, transicionales y maduros correlacionó positivamente con el nivel de activación de varias poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, en concreto de los linfocitos T totales, Th1, Th22 y Th17 (Tabla 31); de forma similar, la activación de linfocitos B *switched* DN también correlacionó positivamente con la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales, Th1, Th2, Th9 y Tregs (Tabla 31). Los niveles de BAFF en sangre correlacionaron de forma positiva con el porcentaje de Th2 y la activación de los Th1 y Th17 (Tabla 31).

En cuanto a los niveles de proteínas en plasma, se encontró una correlación positiva entre el nivel de activación de los plasmoblastos y el porcentaje de linfocitos B naïve y los niveles de BAFF e IgA en sangre; en contraposición, los niveles de BAFF e IgA presentaron una correlación negativa con el porcentaje de linfocitos B de memoria y el porcentaje y recuento de linfocitos B *switched* (Tabla 32). El contenido de CD19 en VE, un marcador de linfocitos B, correlacionó positivamente con la mayoría de las poblaciones estudiadas, en concreto con el porcentaje y/o recuentos de linfocitos B totales, inmaduros, transicionales, maduros y naïve, así como una correlación negativa con los linfocitos B de memoria (Tabla 32). Por último, se obtuvieron correlaciones significativas entre el contenido de glutamina sintetasa en VE con parámetros de linfocitos B totales, maduros y naïve, correlaciones negativas con el recuento y positivas para la activación (Tabla 32).

Resultados

**Tabla 31. Correlaciones bivariadas entre el porcentaje, recuento y activación de poblaciones de linfocitos B con el porcentaje, recuento y activación de poblaciones de linfocitos T.**

Población linfocito B	Población (%)					Recuento (células/ $\mu$ L)				Linfocitos T CD4+	Activación (% CD69 <sup>+</sup> )						
	Th1	Th2	Thf	Th22	Th17	Th2	Thf	Th22	Th17		Th1	Th2	Thf	Th22	Th17	Th9	Tregs
<b>Linfocitos B</b>																	
Población (%)																	
Recuento (células/ $\mu$ L)	0,716**			-0,500*	-0,476*												
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )		0,457*														0,430*	
<b>Plasmoblastos</b>																	
Población (%)																0,461*	
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )																0,423*	
<b>B inmaduros</b>																	
Población (%)										0,506*		0,678**	0,541**	0,563**			
Recuento (células/ $\mu$ L)										0,650**	0,588**	0,649**		0,592**			
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )				0,506*	0,463*							-0,491*	-0,558*	-0,497*			
<b>B transicionales</b>																	
Población (%)										0,463*		0,672**	0,559**	0,601**			
Recuento (células/ $\mu$ L)										0,615**	0,543*	0,659**		0,565*			
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )			-0,485*	0,636**	0,664**			-0,473*						-0,471*		0,576**	
<b>B maduros</b>																	
Población (%)										-0,486*		-0,676**	-0,533*	-0,484*			
Recuento (células/ $\mu$ L)	0,723**			-0,483*	-0,468*												
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )		0,459*															
<b>B naïve</b>																	
Población (%)																-0,423*	
Recuento (células/ $\mu$ L)	0,688**																
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )		0,479*															
<b>B de memoria</b>																	
Población (%)																0,438*	
Recuento (células/ $\mu$ L)	0,566*															0,490*	
<b>B switched</b>																	
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )												0,438*				0,427*	
<b>B switched DN</b>																	
Población (%)		-0,488*								-0,535**	-0,593**						
Recuento (células/ $\mu$ L)	0,617**			-0,436*						-0,656**	-0,575**						
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )										0,698**	0,671**	0,430*			0,561**	0,493*	
<b>Proteínas en plasma</b>																	
BAFF						0,624**						0,619**		0,492*			
IgA			-0,517*														

Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

**Tabla 32. Correlaciones bivariadas entre el porcentaje, recuento y activación de poblaciones de linfocitos B con los niveles proteínas en plasma y contenido proteico en VE.**

Población linfocito B	Proteínas en plasma				Marcadores específicos de origen celular en VE					Marcadores de inflamación en VE		Enzimas del metabolismo del amonio en VE	
	BAFF	APRIL	BDNF	IgA	IL-17	CD4	CD8	CD19	CD86	L1CAM	TGF-β	TNFR1	Glutamina sintetasa
<b>Linfocitos B</b>													
Población (%)						0,444*						0,414*	-0,707*
Recuento (células/μL)													-0,681*
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )													0,689*
<b>Plasmoblastos</b>													
Población (%)		0,339*											
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )	0,311*			0,310*									
<b>B inmaduros</b>													
Recuento (células/μL)													0,679**
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )					0,293*								
<b>B transicionales</b>													
Recuento (células/μL)													0,681**
<b>B maduros</b>													
Recuento (células/μL)													0,659**
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )													-0,574*
<b>B naïve</b>													
Población (%)	0,424**			0,327*					0,539*	-0,435*			
Recuento (células/μL)					0,543**	0,459*		0,723**					-0,607*
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )													0,695*
<b>B de memoria</b>													
Población (%)	-0,436**			-0,334*					-0,562*	0,443*			
Recuento (células/μL)													-0,405*
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )											-0,444*		
<b>B unswitched</b>													
Población (%)	-0,383*				0,292*					0,571**			
Recuento (células/μL)	-0,313*				0,407**					-0,435*			-0,457*
<b>B switched</b>													
Población (%)	-0,447**		0,318*	-0,379**									
Recuento (células/μL)	-0,405**		0,292*	-0,292*	0,343*								
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )	0,386**												
<b>B switched DN</b>													
Población (%)			0,299*										
Recuento (células/μL)	-0,287*												
<b>Proteínas en plasma</b>													
BAFF	-			0,532**								-0,403*	
IgA				-		0,545**		-0,432*					0,587*

Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

### 9.2.2. Correlaciones entre parámetros de poblaciones del inmunofenotipo T

En la Tabla 33 se muestran las correlaciones entre el recuento y activación de algunas poblaciones de linfocitos T con la activación de otras poblaciones de linfocitos T.

Se obtuvo una correlación positiva entre el recuento de los linfocitos Th2 con la activación de esta misma población y con la población de Thf; de la misma forma, se obtuvo una correlación positiva entre el nivel de activación de linfocitos Th2 y Thf (Tabla 33). La activación de los linfocitos Tregs correlacionó negativamente con la activación de las poblaciones Th22 y Th17 (Tabla 33).

**Tabla 33. Correlaciones bivariadas entre el recuento y activación de poblaciones de linfocitos T con la activación de otras poblaciones de linfocitos T.**

Población linfocito T	21			
	Th2	Thf	Th9	Tregs
<b>Th2</b>				
Recuento (células/ $\mu$ L)	0,397*	0,494*		
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )		0,427*		
<b>Th22</b>				
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )				-0,380*
<b>Th17</b>				
Activación (% CD69 <sup>+</sup> )				-0,373*

Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson. (\*:  $p < 0,05$ ).

### 9.2.3. Correlaciones entre marcadores de origen celular y el contenido de moléculas de interés en vesículas extracelulares

En la Tabla 34 se muestran las correlaciones entre marcadores de origen celular y el contenido proteico en VE.

Los resultados más destacados se dan con el contenido de MHC II en VE, que correlacionó positivamente con los marcadores de CD4, CD8, CD19 y L1CAM, mientras que presentó una correlación negativa con el marcador de CD86. El contenido en CD74 también evidenció una correlación positiva con CD8, CD19 y L1CAM. En VE el contenido de moléculas que favorecen el ambiente pro-inflamatorio, como son TNF- $\alpha$ , ADAM17 y TNFR1 correlacionó positivamente con varios de los marcadores de origen celular (Tabla 34).

**Tabla 34. Correlaciones bivariadas entre el contenido proteico en VE de marcadores de origen celular y el contenido de moléculas de interés.**

Marcador de origen celular en VE	Moléculas implicadas en la presentación de antígenos en VE			Marcadores de inflamación en VE			
	MHC I	MHC II	CD74	TGF- $\beta$	TNF- $\alpha$	ADAM 17	TNFR1
CD3					0,318*		
CD4		0,419**				0,379**	0,670**
CD8		0,346*	0,410**		0,411**		0,375**
CD19	0,559**	0,427*	0,490**	-0,442*		0,529**	
CD86		-0,367*					
CD14	0,354*					0,271*	0,468**
L1CAM		0,309*	0,589**		0,369**		0,285*

Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson. (\*:  $p < 0,05$ ).

### 9.3. Estudio de la capacidad predictiva de los parámetros analizados en el diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima

Para el estudio de la capacidad predictiva de los parámetros analizados en el diagnóstico de la EHM se realizó un análisis de curvas ROC con los parámetros significativamente diferentes en los pacientes con EHM con respecto a los pacientes sin EHM. El AUC de cada parámetro significativo varía de 0,5 a 1, donde un valor de 1 representa un parámetro que diagnostica la enfermedad perfectamente, mientras que un 0,5 representa un parámetro sin capacidad diagnóstica. Con este análisis se obtiene un punto de corte para cada parámetro, esto es, un valor que nos permite diferenciar a los pacientes EHM del resto de pacientes con enfermedad hepática. Este punto de corte lleva asociado un porcentaje de sensibilidad y especificidad; en nuestro caso la sensibilidad representa el porcentaje de pacientes con EHM bien diagnosticados y la especificidad el porcentaje de pacientes sin EHM bien diagnosticados. Los datos de AUC, significancia, punto de corte, sensibilidad y especificidad para los parámetros analizados significativos se muestran en la tabla 34, ordenados de mayor a menor AUC.

Este análisis mostró que los parámetros con mayor capacidad predictiva de la EHM son el coeficiente Th1/Th2, el contenido en VE de los marcadores CD8, CD86 y CD19, el porcentaje de linfocitos B totales y el contenido en VE de la molécula pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  y de moléculas relacionadas con la activación de linfocitos T, como MHC II y CD74 (Tabla 35).

## Resultados

También se obtuvo una buena capacidad predictiva de la EHM con los niveles en sangre de IgA, BAFF y amonio, pero menores a los comentados anteriormente (Tabla 35).

**Tabla 35. Curvas ROC de parámetros inmunológicos estudiados para evaluar su capacidad predictiva en el diagnóstico de la EHM.**

Parámetros	AUC (95% IC)	p-valor	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Cociente Th1/Th2	0,796 (0,550 – 1,000)	0,03	1,835	85,71	71,43
Contenido CD8 en VE	0,759 (0,612 – 0,907)	0,005	109,56 <sup>a</sup>	66,67	73,68
Contenido CD86 en VE	0,739 (0,565 – 0,913)	0,019	93,65 <sup>a</sup>	76,47	68,75
Linfocitos B total	0,735 (0,568 – 0,901)	0,014	13,5 <sup>b</sup>	64,29	67,86
Contenido CD19 en VE	0,729 (0,552 – 0,907)	0,027	113,66 <sup>a</sup>	73,33	76,47
Contenido TNF- $\alpha$ en VE	0,727 (0,572 – 0,883)	0,012	114,81 <sup>a</sup>	80	68,18
Contenido MHC II en VE	0,708 (0,546 – 0,870)	0,025	121 <sup>a</sup>	57,89	80,95
Contenido CD74 en VE	0,697 (0,531 – 0,863)	0,033	133,77 <sup>a</sup>	76,19	63,16
IgA (ng/mL)	0,676 (0,527 – 0,824)	0,025	2767,21 <sup>c</sup>	65,22	62,85
BAFF (pg/mL)	0,659 (0,506 – 0,812)	0,046	444,63 <sup>d</sup>	77,27	50
Amonio ( $\mu$ M)	0,649 (0,548 – 0,750)	0,004	26,67 <sup>e</sup>	63,04	72,04

Se muestran los resultados del análisis de curvas ROC de diferentes parámetros inmunológicos estudiados para evaluar su capacidad predictiva en el diagnóstico de la EHM. Se presentan para cada parámetro los datos de AUC, IC al 95%, p-valor, punto de corte, sensibilidad y especificidad. IC: intervalo de confianza. Punto de corte: <sup>a</sup>: % del control; <sup>b</sup>: %; <sup>c</sup>: ng/mL; <sup>d</sup>: pg/mL; <sup>e</sup>:  $\mu$ l.







## **VII. DISCUSIÓN**



## **1. Diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima y caracterización de las alteraciones cognitivas y motoras asociadas**

La EH es un síndrome neuropsiquiátrico complejo caracterizado por una alteración funcional del SNC a consecuencia de una insuficiencia hepática crónica o aguda, presentando un amplio espectro de manifestaciones neurológicas y psiquiátricas, desde manifestaciones subclínicas hasta el coma<sup>5</sup>. La EHM es la primera etapa en el espectro de la EH y se considera el mayor factor de riesgo para su desarrollo. La EHM no se detecta en un examen clínico general ya que los pacientes no presentan síntomas clínicos, sino que se detecta mediante test neuropsicológicos específicos<sup>9-11</sup>.

Actualmente la herramienta por excelencia para el diagnóstico de la EHM en pacientes con enfermedad hepática es la batería de test psicométricos PHES; de hecho, durante el 14º Congreso de la ISHEN (2010) se llegó al consenso que para estudios multicéntricos se debía utilizar dos métodos diagnósticos de la EHM, siendo uno de ellos siempre la batería PHES<sup>19,22,149</sup>.

La batería PHES consta de 5 subtest que se realizan en papel y que evalúan velocidad de procesamiento (mediante el DST, NCT-A y NCT-B), memoria de trabajo (mediante DST), atención (mediante NCT-A y NCT-B) y coordinación visuoespacial (mediante SDT y LTT); indirectamente también se evalúa la percepción visual, orientación visuo-espacial, concentración y coordinación motora, ya que son funciones que se requieren para una buena realización de la batería PHES, aunque no se evalúen directamente<sup>149</sup>. La puntuación PHES se obtiene a partir de los resultados de cada subtest y es corregida en función de la edad y el nivel de estudios del sujeto mediante una aplicación informática que utiliza unos valores de referencia para la población española normal<sup>150</sup>. Una puntuación PHES  $\leq -4$  clasifica al paciente como paciente con EHM (apartado 4.1. de Materiales y Métodos).

Las principales ventajas de la utilización de la batería PHES en el diagnóstico de la EHM es que no requiere equipamiento especializado y su bajo coste económico; por otro lado, como principal inconveniente encontramos el tiempo de explicación, realización y corrección del test, que es de alrededor de 20 minutos, lo cual dificulta su realización en la práctica clínica.

## *Discusión*

Durante esta tesis se utilizó la batería PHES para el diagnóstico de los pacientes cirróticos. De los 131 pacientes con enfermedad hepática aproximadamente el 30% fueron clasificados como pacientes con EHM, similar a la prevalencia obtenida en otros estudios recientes<sup>165,166</sup>; aunque otros autores reportan una prevalencia mayor de alrededor del 50% en otras poblaciones, como población china, mexicana y nortamericana<sup>405-407</sup>. Estos datos ponen de manifiesto que la EHM se presenta en gran parte de los pacientes con insuficiencia hepática crónica. Los inconvenientes en la realización de la batería PHES y la falta métodos clínicos diagnósticos y de biomarcadores que ayuden a diagnosticar la patología, conllevan que en muchos pacientes no se diagnostique. La presencia de EHM predispone a desarrollar episodios de EH clínica si la EHM no es diagnosticada y tratada a tiempo, generando un problema sanitario, social y económico mayor.

En esta tesis, además de emplear la batería de test psicométricos PHES para el diagnóstico de la EHM, se realizaron otras pruebas psicométricas más sensibles para caracterizar de forma más precisa las alteraciones cognitivas y motoras asociadas a la aparición de la EHM. Estas pruebas permiten evaluar la velocidad de procesamiento, atención selectiva, flexibilidad cognitiva, inhibición de la respuesta automatizada, atención selectiva-sostenida, concentración, memoria de trabajo y coordinación motora. Los resultados de estas pruebas y las alteraciones observadas se presentan esquematizados en la tabla 36.

**Tabla 36. Alteraciones cognitivas y motoras evaluadas mediante pruebas psicométricas comparando los tres grupos de estudio.**

		Sin EHM vs. Control	EHM vs. Control	EHM vs. Sin EHM
<b>Velocidad de procesamiento y atención selectiva:</b> Test oral de claves	Total ítems	↓	↓	↓
	Total aciertos	↓	↓	↓
	Total errores	-	-	-
<b>Flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada:</b> Test Stroop	Tarea congruente	-	↓	↓
	Tarea neutra	-	↓	↓
	Tarea incongruente	↓	↓	↓
<b>Atención selectiva-sostenida y concentración:</b> Test d2	TR	↓	↓	↓
	TA	↓	↓	↓
	O	-	-	-
	C	-	↑	↑
	TOT	↓	↓	↓
	CON	↓	↓	↓
<b>Memoria de trabajo:</b> Test oral de dígitos y test oral de letras y números	Aciertos dígitos directos	-	↓	↓
	Aciertos dígitos inversos	-	↓	-
	Aciertos letras y números	↓	↓	↓
<b>Coordinación motora:</b> Test de coordinación	Bimanual	-	↓	↓
	Visuo-motora	-	↓	↓

↑: aumento significativo, ↓: disminución significativa, -: sin diferencias significativas, TR: total respuestas; TA: total aciertos; O: errores por omisión; O: errores por comisión; TOT: índice de efectividad, CON: índice de concentración.

### 1.1. Velocidad de procesamiento y atención selectiva

Para la evaluación de la velocidad de procesamiento y atención selectiva se utilizó principalmente el test de claves oral, donde el total de ítems nos permite evaluar la velocidad de procesamiento, el total de aciertos la velocidad de procesamiento y atención selectiva y el total de errores, de forma indirecta, la atención selectiva (apartado 4.2.2. de Materiales y Métodos). Por otra parte, la atención selectiva también se puede evaluar con el parámetro TA e indirectamente por los errores realizados en el test d2. La velocidad de procesamiento también se evalúa con el parámetro TR del test d2 y las tareas congruente y neutra del test Stroop.

Considerando los resultados del test oral de claves la velocidad de procesamiento y atención selectiva en ambos grupos de pacientes cirróticos estaba reducida con respecto a los controles, siendo esta alteración significativamente más acusada en los pacientes con EHM que en los pacientes sin EHM (Tabla 36). El hecho de que los sujetos sin EHM presenten alteraciones en la velocidad de procesamiento y atención selectiva en menor medida, denota que estos cambios son de los primeros en producirse a consecuencia de la enfermedad hepática y que estas alteraciones no son capaces de ser diagnosticadas por el PHES, como se demostró en estudios anteriores<sup>167</sup>. Se observó el mismo patrón al evaluar la velocidad de procesamiento y la atención selectiva mediante los parámetros del test d2, TR y TA, respectivamente (Tabla 36).

Mediante las tareas congruente y neutra del test Stroop también se puede evaluar la velocidad de procesamiento. En este caso, a diferencia del test oral de claves, se observa un empeoramiento en la velocidad de procesamiento solo en los pacientes con EHM (Tabla 36), de lo que podemos deducir que el test Stroop no es tan sensible o eficaz en detectar alteraciones leves en la velocidad de procesamiento como el test oral de claves o el parámetro TR del test d2. Lo mismo ocurre con el parámetro C del test d2, que solo está alterado en pacientes con EHM y no es suficientemente sensible como para evaluar alteraciones tempranas en la atención selectiva como lo hace el test oral de claves o el parámetro TA del test d2 (Tabla 36).

## **1.2. Flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada**

Mediante la tarea incongruente del test Stroop se puede valorar la flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada. En esta prueba al sujeto se le presentan palabras que designan colores, pero escritos con tinta de otro color, y para que una respuesta se considere correcta el sujeto debe decir el color de la tinta, inhibiendo la acción habitual o automatizada de leer la palabra (apartado 4.2.1. de Materiales y Métodos).

Los pacientes cirróticos presentaron una disminución en la flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada evaluadas mediante la tarea incongruente del test Stroop, siendo esta disminución más acusada en pacientes con EHM (Tabla 36). Al igual que sucedía con la velocidad de procesamiento y atención selectiva, dado que las alteraciones evaluadas por la tarea incongruente del test Stroop también se presentan en menor medida en pacientes sin EHM (Tabla 36), estas serían de las primeras en producirse como consecuencia del daño hepático y la batería PHES no sería capaz de diagnosticarlas.

### **1.3. Atención selectiva-sostenida y concentración**

La atención selectiva-sostenida y concentración se valoran con el índice de efectividad y el índice de concentración del test d2 respectivamente (apartado 4.2.5. de Materiales y Métodos). Los resultados de estos parámetros indicaban que los pacientes cirróticos presentaban una disminución en las capacidades de atención selectiva-sostenida y concentración con respecto a los controles, que era más acusada en pacientes con EHM (Tabla 36). Al igual que otras funciones ejecutivas comentadas anteriormente, estos resultados sugieren que alteraciones en la atención selectiva-sostenida y concentración son de las primeras en presentarse en los pacientes con insuficiencia hepática, y que estas alteraciones no son diagnosticadas mediante el PHES.

### **1.4. Memoria de trabajo**

Para la evaluación de la memoria de trabajo se emplearon el test oral de dígitos y el test oral de letras y números (apartado 4.2.3 y 4.2.4. de Materiales y Métodos). Los pacientes con EHM presentan un déficit en la memoria de trabajo con respecto a los pacientes sin EHM y los controles, como indica los resultados del test oral de letras y números (Tabla 36). Esta alteración también se presenta en los pacientes sin EHM en menor medida, lo que se traduce en que el empeoramiento en la memoria de trabajo también es una de las primeras alteraciones cognitivas que se presentan en la EHM y que la batería PHES no es capaz de detectarla.

El test oral de dígitos directo también pone de manifiesto el empeoramiento en la memoria de trabajo, pero solo en los pacientes con EHM (Tabla 36), por lo que este test sería menos sensible en detectar pequeños cambios en la memoria de trabajo. Esta diferencia entre test de memoria de trabajo se puede deber a que el test oral de letras y números es más exigente y requiere una capacidad de memoria de trabajo plena, por el contrario, el test oral de dígitos directo es más sencillo y pequeñas deficiencias en la memoria de trabajo no afectan significativamente en los resultados del test.

### **1.5. Coordinación motora**

La coordinación motora de los pacientes se examinó mediante los test de coordinación bimanual y visuo-motora, en los cuales se emplea la coordinación de las dos manos conjuntas o de la mano dominante, respectivamente (apartado 4.3. de Materiales y Métodos).

Los resultados de ambos test indican que los pacientes con EHM presentan peor coordinación motora en comparación con los pacientes sin EHM y los controles (Tabla 36). Estas alteraciones no se observaron en pacientes sin EHM (Tabla 36), por lo que esta peor coordinación aparecería en las últimas fases del deterioro cognitivo asociado a la enfermedad hepática y solo se manifiesta en pacientes diagnosticados con EHM por la batería PHES.

En resumen, los resultados obtenidos corroboran que los pacientes con EHM presentan alteraciones cognitivas y motoras asociadas, en concreto una reducción en la velocidad de procesamiento, atención selectiva, atención selectiva-sostenida, concentración, flexibilidad cognitiva, memoria de trabajo y coordinación motora<sup>13-16</sup>. Estas alteraciones son sutiles, indetectables en la clínica diaria, y son responsables de la reducción en calidad y esperanza de vida e incremento de accidentes y hospitalizaciones de los pacientes que las sufren, convirtiendo la EHM en un problema social, económico y sanitario importante<sup>168-171</sup>.

Algunas de las alteraciones detectadas en pacientes con EHM ya se presentan en el grupo de pacientes sin EHM en menor medida, como la reducción en velocidad de procesamiento, atención selectiva, atención selectiva-sostenida, concentración, flexibilidad cognitiva y memoria de trabajo. Esto sugiere que estas alteraciones son las primeras en aparecer en el espectro de la EHM y que no son detectadas por la batería PHES, poniendo de manifiesto la incapacidad de la batería PHES para detectar todas las alteraciones cognitivas asociadas a la EHM<sup>167</sup>.

## **2. Alteraciones en el inmunofenotipo de linfocitos B y linfocitos T CD4<sup>+</sup> en pacientes con encefalopatía hepática mínima**

En estudios anteriores realizados en pacientes con EHM se observaron diversos cambios a nivel de inmunofenotipo en diversas poblaciones de leucocitos. Los cambios más significativos fueron un aumento de los monocitos pro-inflamatorios y de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria y autorreactivos, además de una mayor activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales, de memoria y autorreactivos<sup>112</sup>. En relación a la población de linfocitos B, se observó un aumento en los niveles de IgG en plasma de estos pacientes y se hipotetiza que el aumento de la IL-22 y la CXCL13 juegan un papel clave en la infiltración de linfocitos B dentro del SNC y formación de órganos linfoides terciarios, procesos que se han identificado en patologías autoinmunes como la esclerosis múltiple<sup>112,172,173</sup>. Esto sugiere que cambios en las poblaciones linfocitarias



podrían estar induciendo o mediando la EHM, lo que pone de manifiesto la necesidad de seguir caracterizando los cambios en el inmunofenotipo de pacientes con EHM.

En el estudio de las poblaciones de linfocitos B mediante citometría de flujo se observó un aumento en los linfocitos B totales en pacientes con EHM con respecto al resto de grupos, así como un aumento en los linfocitos B naïve y una reducción de los linfocitos B de memoria (Tabla 37). También se observó una reducción en la proporción de los subtipos de linfocitos B de memoria en pacientes cirróticos (Tabla 37). Existen diferentes señales que median la diferenciación de los linfocitos, como BAFF, APRIL y BDNF, y el análisis de sus niveles en plasma reveló un aumento de los niveles de BAFF en pacientes con EHM y una disminución en los de APRIL y BDNF en pacientes cirróticos.

BAFF se ha encontrado elevado en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico<sup>174</sup>. La magnitud de la señalización por BAFF puede provocar alteraciones en la regulación de la inmunidad y pérdida de los procesos de tolerancia, así como inducción de la expresión de oncogenes en linfocitos B, favoreciendo la evasión de linfocitos B autorreactivos de los procesos de apoptosis y su salida a la periferia<sup>175-178</sup>. En relación con estos datos, se encontraron niveles altos de BAFF en líquido cefalorraquídeo y cerebros de pacientes con esclerosis múltiple y otras patologías autoinmunes, apoyando los estudios que relacionan la acción de los linfocitos B autorreactivos y autoanticuerpos en patologías autoinmunes como la esclerosis múltiple y que junto a la quimiocina CXCL13, participarían en el reclutamiento y activación de los linfocitos B<sup>179-181</sup>.

**Tabla 37. Alteraciones en el inmunofenotipo de linfocitos B comparando los tres grupos de estudio.**

		Sin EHM vs. Control	EHM vs. Control	EHM vs. Sin EHM
<b>Linfocitos B totales</b>	% Poblacional	-	↑	↑
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos B inmaduros</b>	% Poblacional	-	-	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos B transicionales</b>	% Poblacional	-	-	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos B maduros</b>	% Poblacional	-	-	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos B naïve</b>	% Poblacional	-	↑	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos B memoria</b>	% Poblacional	-	↓	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos B <i>unswitched</i></b>	% Poblacional	↓	↓	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos B <i>switched</i></b>	% Poblacional	↓	↓	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos B <i>switched</i> DN</b>	% Poblacional	-	-	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Plasmoblastos</b>	% Poblacional	-	-	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-

↑: aumento significativo, ↓: disminución significativa, -: sin diferencias significativas, DN: doble negativo.

El aumento de los linfocitos B totales exclusivamente en pacientes con EHM podría atribuirse a los niveles elevados de BAFF, que favorecería su supervivencia. Esta misma citocina podría estar mediando la generación de linfocitos B autorreactivos a nivel periférico, generando autoanticuerpos que favorecerían las alteraciones inmunológicas en estos pacientes. Por otra parte, los niveles aumentados de BAFF también podrían favorecer, junto a CXCL13, la infiltración de estos linfocitos B a nivel intracerebral, la formación de órganos linfoides

terciarios y la generación de autoanticuerpos, provocando neuroinflamación. Esto ya se hipotetizó para estos pacientes en estudios anteriores y se ha demostrado en esclerosis múltiple, pero análisis más detallados serían necesarios para evaluar los niveles de autoanticuerpos en los pacientes con EHM.

El BDNF es una neurotrofina esencial para el desarrollo y función neural, pero algunos estudios postulan que también tiene un papel en la modulación y regulación del sistema inmunitario. Algunos estudios demuestran que esta neurotrofina está implicada en el desarrollo de los linfocitos B, concretamente en estadios anteriores a los linfocitos B inmaduros y que la deficiencia en BDNF reduciría la proporción de estos estadios y provocaría un descenso en los estadios posteriores, como los linfocitos B inmaduros<sup>408</sup>. En este estudio, la disminución de los niveles de BDNF no se correlaciona con una disminución de la población de linfocitos B inmaduros, sino que encontramos una disminución en los fenotipos de memoria, por lo que son necesarios más estudios para evaluar el posible papel del BDNF en el desarrollo de los linfocitos B en pacientes con EHM.

En cuanto a las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los principales cambios que se observaron en los pacientes con EHM fueron un aumento en la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales, en el porcentaje de linfocitos Th2, Th22, Th17 y Th9 y en el cociente Th17/Tregs (Tabla 38). También se observó en los pacientes con EHM una reducción en el porcentaje de linfocitos Th1, y en consecuencia una reducción en el cociente Th1/Th2 (Tabla 38).

**Tabla 38. Alteraciones en el inmunofenotipo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> comparando los tres grupos de estudio.**

		Sin EHM vs. Control	EHM vs. Control	EHM vs. Sin EHM
<b>Linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales</b>	% Poblacional	-	-	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	↑	↑
<b>Linfocitos Th1</b>	% Poblacional	-	↓	↓
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos Th2</b>	% Poblacional	-	↑	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Coefficiente Th1/Th2</b>		-	↓	↓
<b>Linfocitos Th folicular</b>	% Poblacional	-	-	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos Th22</b>	% Poblacional	-	↑	↑
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos Th17</b>	% Poblacional	-	↑	↑
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos Th9</b>	% Poblacional	-	↑	↑
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Linfocitos T reguladores</b>	% Poblacional	-	-	-
	% Células CD69 <sup>+</sup>	-	-	-
<b>Coefficiente Th17/T reguladores</b>		-	↑	↑

↑: aumento significativo, ↓: disminución significativa, -: sin diferencias significativas.

Los fenotipos Th17, Th22 y Th9, aumentados en pacientes con EHM (Tabla 38), expresan en su membrana el receptor CCR6, cuyo ligando es CCL20; esta interacción juega un papel pro-inflamatorio en enfermedades autoinmunes y está implicada en el reclutamiento patológico de estas células a través de la BHE en la EAE<sup>182-186</sup>.

El aumento de las poblaciones Th17, Th22 y Th9 conllevaría a un aumento de sus citocinas características en pacientes con EHM, es decir, un aumento de IL-17, IL-22 e IL-9 respectivamente. El aumento de estas poblaciones y de sus citocinas podría mediar la

disrupción de la BHE, la infiltración de estos linfocitos y la inducción de la neuroinflamación en pacientes con EHM, como se ha demostrado en otro tipo de patologías<sup>72,79,81,187,188</sup>.

La IL-17 y los Th17 también juegan un papel importante en la génesis de linfocitos T autorreactivos y B autorreactivos<sup>62,189</sup>. En pacientes con EHM podría estar promoviendo el aumento y activación de linfocitos T autorreactivos, previamente descrito por nuestro grupo<sup>112</sup>. Futuros análisis serán necesarios para evaluar si en pacientes con EHM existe una mayor proporción de linfocitos B autorreactivos y/o producción de autoanticuerpos, y si estos están condicionados por la acción de la IL-17 y los Th17.

La IL-9 promueve la diferenciación de Th17 desde CD4 naïve y su infiltración en el SNC vía CCL20 producido por los astrocitos<sup>186,190,191</sup> y está implicada en la patogénesis de la EAE, ya que si se neutraliza la IL-9 se atenúa la gravedad de la enfermedad<sup>55</sup>. De igual forma, el aumento del porcentaje de Th9 en pacientes con EHM conllevaría un aumento de los niveles de IL-9 en sangre, que promovería los efectos patológicos de los Th17.

El cociente Th1/Th2 nos indica qué tipo de respuesta inmunitaria prevalece. Un aumento de este cociente se traduce en un aumento de los linfocitos Th1, característico de la respuesta tipo 1 frente a patógenos intracelulares. En cambio, una disminución de este cociente implica un aumento de los Th2, característico de la respuesta tipo 2 frente a patógenos extracelulares y se promueve la respuesta humoral<sup>193</sup>. La disminución del cociente Th1/Th2 en pacientes con EHM (Tabla 38) podría estar relacionado con una respuesta Th2 frente a patógenos extracelulares, ya que en pacientes cirróticos se produce un aumento de endotoxinas procedentes de bacterias Gram-negativas que desarrollarían esta respuesta<sup>210-212</sup>. En sepsis se ha observado disminución en la proporción de Th1, aumento de Th17 y sin cambios en los Tregs, así como un aumento en la expresión génica de TLR y los niveles séricos de IL-22<sup>409-412</sup>, al igual que observamos en pacientes con EHM en este y estudios anteriores<sup>112</sup>. Aunque en menor medida, estos cambios en pacientes con EHM se podrían relacionar con un aumento de la translocación bacteriana y sus subproductos, lo que favorecería la disminución del cociente Th1/Th2 en estos pacientes.

Por otra parte, un aumento en el cociente Th17/Tregs se relaciona con enfermedades autoinmunes y es indicativo de un estado inflamatorio, debido a un aumento en los linfocitos Th17, el cual promueve la inflamación, y una disminución de los Tregs, con una función anti-inflamatoria<sup>192</sup>. En otras patologías que cursan con inflamación periférica, neuroinflamación y

deterioro cognitivo como la enfermedad de Parkinson, también se ha observado un aumento en el cociente Th17/Tregs<sup>193</sup>. El aumento del cociente Th17/Tregs en pacientes con EHM (Tabla 38) denota un estado pro-inflamatorio y una falta de fenotipos anti-inflamatorios en estos pacientes, lo que agrava el resto de las alteraciones inmunológicas observadas.

### **3. Estudio de los cambios en expresión génica y contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con encefalopatía hepática mínima**

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> están implicados en diversas patologías que cursan con inflamación periférica y neuroinflamación como la esclerosis múltiple. Los resultados anteriormente comentados y los de estudios anteriores del grupo ponen de manifiesto que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tienen un papel importante en el curso de la EHM. Al igual que en otras patologías, alteraciones en el patrón de expresión génica de estas células podrían ser las responsables de sus efectos patológicos. Por ello, conocer el patrón de expresión de ciertas moléculas y proteínas que regulan este proceso en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM mejoraría la comprensión de los procesos que desencadenan la inflamación periférica.

El estudio de la expresión génica reveló una sobre-expresión en pacientes cirróticos de los ARN mensajeros asociados al receptor CCR2 y a las citocinas IL-6 e IL-17, mientras que en pacientes con EHM la expresión del ARN mensajero de la IL-17 y del receptor TLR4 era significativamente mayor al resto de grupos (Tabla 39). Los niveles de expresión de los mensajeros de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no se veían alterados (Tabla 39). Para relacionar la discrepancia entre los niveles de ARN mensajero y los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se analizaron los niveles de proteínas que regulan negativamente el proceso de transducción de estas citocinas, como TTP y A20, y encontramos que estaban disminuidas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sujetos con EHM (Tabla 39).

**Tabla 39. Cambios en la expresión génica y contenido proteico en linfocitos T CD4<sup>+</sup> comparando los grupos de estudio.**

		Sin EHM vs. Control	EHM vs. Control	EHM vs. Sin EHM
<b>Expresión de ARNm</b>	CCR2	↑	↑	-
	CD86	-	↓	-
	TLR2	-	-	-
	TLR4	-	↑	↑
	IL-6	↑	↑	-
	IL-17	↑	↑	↑
	TNF-α	-	-	-
	IL-1β	-	-	-
<b>Contenido proteico</b>	TNF-α	-	-	-
	IL-1β	↑	↑	↑
	TTP	-	↓	↓
	A20	-	↓	↓
	Glutaminasa	↑	↑	-

↑: aumento significativo, ↓: disminución significativa, -: sin diferencias significativas.

La quimiocina CCL2 es el ligando del receptor CCR2, expresado en monocitos y linfocitos T, implicada en inflamación y atracciones de estos tipos celulares<sup>194</sup>. El receptor CCR2 juega un papel importante en algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o esclerosis múltiple, donde media una migración aberrante<sup>195,196</sup>. Por otra parte, en modelos de inflamación hepática, se ha encontrado que la microglía se activa y genera CCL2, promoviendo la infiltración de monocitos dentro del SNC<sup>197</sup>. De igual forma, del aumento de CCR2 en pacientes cirróticos (Tabla 39) favorecería la infiltración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> dentro del SNC, como se observó en pacientes cirróticos y con EH<sup>198</sup>, que podría intensificarse en pacientes con EHM debido a las alteraciones en el sistema inmunitario de estos pacientes que alterarían la integridad de su BHE, especialmente por acción de la IL-17<sup>70-72,112</sup>.

Los TLR son capaces de detectar PAMP e iniciar una cascada de señalización que desemboca en la producción de citocinas pro-inflamatorias y otras moléculas vía NF-κB para hacer frente al patógeno, pero una alteración en la activación de estos receptores puede desembocar en una excesiva inflamación o enfermedades autoinmunes<sup>199-201</sup>. Alteraciones en la activación de los

## Discusión

TLR, especialmente en el TLR4, se han relacionado con la esclerosis múltiple, ya que estos pacientes y modelos de EAE presentan un aumento del TLR4<sup>202-204</sup>; además, la administración de ligandos del TLR4 como LPS agravan la EAE en modelos animales, mientras que el bloqueo de estos receptores la previene<sup>205-207</sup>.

La activación de los TLR4 mediante LPS también está implicada en la diferenciación de los Th17<sup>208</sup>. Qu *et al.* observaron que la expresión de TLR4 estaba aumentada durante el desarrollo de la esclerosis múltiple y de la EAE y que deficiencias en la activación de este receptor inhibía la generación de linfocitos Th17 y la aparición de EAE, demostrando que la activación del TLR4 es esencial para el desarrollo de los linfocitos Th17<sup>209</sup>. El aumento del TLR4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM (Tabla 39), junto a la mayor presencia de LPS en sangre de pacientes cirróticos<sup>210-212</sup>, provocaría mayor activación de estos receptores que conllevaría un aumento de citocinas pro-inflamatorias y de fenotipos Th17 en pacientes con EHM.

En relación con la generación de linfocitos Th17, estudios de inmunometabolismo prueban que un aumento en la glutaminólisis, la transformación de glutamina en glutamato por parte de la glutaminasa, favorece el desarrollo de los linfocitos Th17, mientras inhibe el de los Th1<sup>213</sup>. De este modo, el contenido aumentado de glutaminasa en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes cirróticos (Tabla 39) también favorecería la generación de linfocitos Th17 y reduciría la de los Th1 como se observa en este estudio.

Los pacientes con EHM presentan a nivel sistémico un aumento de citocinas pro-inflamatorias, debido a un aumento de monocitos pro-inflamatorios y a que sus linfocitos T CD4<sup>+</sup> son capaces de liberar mayor cantidad de estas citocinas pro-inflamatorias debido a que están constitutivamente activados, como pueden ser la IL-17 e IL-22<sup>112</sup>. El mecanismo por el cual estos linfocitos de pacientes con EHM sintetizan mayor cantidad de citocinas pro-inflamatorias es desconocido, pero podría deberse a alteraciones en la transcripción del ARNm o de la traducción de este mensajero. La expresión del ARN mensajero de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM presentaban un nivel de expresión que no se correlacionaba con el contenido proteico de estas mismas citocinas en este tipo celular, por lo que debe de existir un mecanismo post-transcripcional que afecte a estas citocinas (Tabla 39). La expresión de estas citocinas podría estar modulada por un mecanismo que implica a las proteínas TTP y A20, que regulan negativamente la síntesis de citocinas pro-inflamatorias al desestabilizar el mensajero de estas citocinas o controlar la activación de la vía NF- $\kappa$ B, respectivamente<sup>84,89-91,98,214</sup>. En linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM encontramos



que el contenido de TTP y A20 está disminuido con respecto a los sujetos sanos o cirróticos sin EHM (Tabla 39). El cambio en el contenido de estas proteínas reguladoras favorecería la síntesis de las citocinas pro-inflamatorias analizadas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM, que se correspondería con los niveles en plasma<sup>112</sup>. En el caso de la expresión del ARN mensajero y del contenido de TNF- $\alpha$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> no se encontraron diferencias entre los grupos de estudio, por lo que el mecanismo de TTP y A20 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> no estaría contribuyendo a los niveles de plasma. Probablemente los niveles elevados de TNF- $\alpha$  en plasma de pacientes con EHM provendrían de otros tipos celulares como los monocitos pro-inflamatorios o intermedios, que son la mayor fuente de esta citocina y se encuentran en mayor proporción en pacientes con EHM<sup>112</sup>.

La función de TTP también afecta al desarrollo y funciones de los linfocitos Th17, ya que en modelos animales deficientes en la proteína TTP se observó un incremento de los niveles séricos de IL-17 y desarrollaron inflamación crónica en la piel con incremento de la población Th17 en las zonas afectadas<sup>215</sup>. La disminución del contenido de TTP en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM podría también estar favoreciendo la generación de linfocitos Th17.

En definitiva, encontramos cambios en el contenido o expresión de ciertas moléculas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM, como son un aumento en el contenido de glutaminasa y la expresión del TLR4 y CCR2 y una disminución en el contenido de TTP y A20 (Tabla 39). Estas alteraciones provocarían en estas células un aumento en la activación y en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y promoverían la generación de linfocitos Th17 a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naïve, consecuencias que se han observado en pacientes con EHM en este estudio y en otros anteriores del grupo<sup>26,112</sup>. Además, estos cambios podrían favorecer su infiltración en el SNC, como se observó en sujetos cirróticos y sujetos con EH<sup>198</sup>.

#### **4. Papel de las vesículas extracelulares en los cambios asociados a la encefalopatía hepática mínima**

Las VE son estructuras formadas por una bicapa lipídica, entre las que podemos identificar los exosomas, de un tamaño entre 40 y 160 nm, generados por un proceso de doble invaginación de la membrana plasmática<sup>114</sup>. Estos exosomas son generados por gran parte de las células, y contienen en su interior o en su superficie proteínas como citocinas, enzimas, receptores o ligandos, así como ácidos nucleicos, predominantemente miARN<sup>113,216</sup>.

## Discusión

La composición en ácidos nucleicos y proteínas de las VE está condicionada por la fisiología de la célula que los genera, es decir, una alteración en la célula de origen producirá cambios en la composición de las VE<sup>147</sup>. Esto les confiere un gran potencial como biomarcadores para el diagnóstico temprano o no invasivo de diversas patologías, especialmente las relacionadas con el SNC, de difícil acceso<sup>114,118,119,148,217</sup>.

Se ha atribuido diversas funciones a estas estructuras, tanto fisiológicas como patológicas. Diversos estudios han demostrado que pueden mediar cambios a nivel inmunológico, como la activación del sistema inmunitario, participar en la respuesta innata y adaptativa, activar linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, alterar el balance entre fenotipos de linfocitos T o activar vías de señalización en células inmunes<sup>125,126,139,218–222</sup>.

Estas VE pueden ejercer su función por dos mecanismos básicos: 1) vertiendo su contenido en la célula diana al fusionarse con la membrana o 2) interaccionando con receptores de la célula diana mediante los ligandos presentes en la superficie<sup>116,223,224</sup>.

### **4.1. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas de plasma de pacientes con encefalopatía hepática mínima**

Las VE se aislaron a partir de plasma de sujetos sanos y pacientes cirróticos mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se confirmó su presencia en la muestra por microscopía electrónica de transmisión, NTA y detección de marcadores específicos de vesículas mediante *western blot* (ver apartado 9 de Materiales y Métodos).

Los resultados nos indicaron que las VE de pacientes cirróticos eran de mayor tamaño y menos abundantes que en el grupo control y que las muestras procedentes de pacientes con EHM contenían mayor cantidad de proteína. En plasma, las VE proceden mayoritariamente de plaquetas, monocitos y células dendríticas, siendo 2/3 de las VE derivadas de plaquetas<sup>225</sup>. Está ampliamente descrito que los pacientes cirróticos presentan un recuento de plaquetas bajo con comparación con sujetos sanos, que se agrava con el abuso de alcohol<sup>226–228</sup>. Este descenso en el recuento de plaquetas también se ha observado en sujetos cirróticos sin y con EHM con respecto a sujetos sanos, sin diferencias entre ambos grupos<sup>229</sup>. El descenso en plaquetas en pacientes sin y con EHM, junto a un leve descenso en el marcador de monocitos CD14 en las VE, explicaría la reducción en el número de VE en pacientes cirróticos. Por otra parte, también se ha descrito una reducción en los marcadores CD14 y CD16 en VE de pacientes con NAFLD, datos que correlacionaban con el aumento en el grado de fibrosis en estos pacientes, lo cual

podría explicar la reducción en estos marcadores en pacientes cirróticos debido a un mayor estado de fibrosis<sup>230</sup>. En otras patologías inflamatorias como el VIH también se observó esta reducción en el total de VE<sup>118</sup> y un aumento en el tamaño medio de las partículas, lo que correlacionaba con parámetros inmunológicos que reflejaban la progresión de la enfermedad<sup>413</sup>. En cuanto al aumento de proteína en muestras procedentes de plasma de pacientes con EHM, esto podría ser consecuencia del aumento en el tamaño de las partículas, lo que aumentaría la cantidad de proteínas internalizadas en su interior. Por otra parte, a diferencia de las VE de pacientes sin EHM, el aumento de ligando y moléculas de superficie observados en el apartado 7 de Resultados en VE procedentes de EHM favorecería al incremento en proteína total de estas muestras.

## **4.2. Caracterización del origen celular de vesículas extracelulares de plasma de pacientes con encefalopatía hepática mínima**

El contenido de las VE, así como su número, se ve alterado en situaciones patológicas. Por otra parte, las VE, mediante sus ligandos de superficie o su contenido proteico, pueden modular la fisiología de la célula diana. Dado que en situaciones patológicas las células alteran el contenido y número de VE liberadas<sup>147</sup>, analizamos mediante *western blot* el contenido proteico de diferentes marcadores de origen celular y de moléculas que podrían contribuir a la fisiopatología de la EHM. Los resultados de los cambios en el contenido proteico se muestran esquematizados en la tabla 40.

**Tabla 40. Cambios en el contenido proteico en VE aisladas de plasma comparando los tres grupos de estudio.**

		Sin EHM vs. Control	EHM vs. Control	EHM vs. Sin EHM
<b>Marcadores específicos de células inmunes</b>	CD3	-	-	-
	CD4	-	↑	↑
	CD8	-	↑	↑
	CD19	-	↑	↑
	CD86	-	↓	↓
	CD14	-	-	-
	CD16	-	↓	↓
<b>Marcadores específicos de células del SNC</b>	L1CAM	-	↑	↑
	CD13	-	-	-
<b>Moléculas implicadas en la presentación de antígenos</b>	MHC I	-	-	-
	MHC II	-	↑	↑
	CD74	-	↑	↑
<b>Marcadores de inflamación</b>	TGF-β	-	↓	↓
	TNF-α	-	↑	↑
	ADAM17	-	↑	↑
	TNFR1	-	-	-
<b>Enzimas implicadas en el metabolismo del amonio</b>	Glutaminasa	-	-	-
	Glutamina sintetasa	-	↑	↑

↑: aumento significativo, ↓: disminución significativa, -: sin diferencias significativas.

Se analizaró en VE el contenido proteico de diferentes moléculas que se utilizan como marcadores de células del sistema inmunitario: CD3 (marcador de linfocitos T), CD4 (marcador de linfocitos Th), CD8 (marcador de linfocitos Tc), CD19 (marcador de linfocitos B), CD86 (marcador de células dendríticas), CD14 (marcador de monocitos) y CD16 (marcador de monocitos pro-inflamatorios). Las VE de pacientes con EHM presentaban un mayor contenido con respecto al resto de grupos en marcadores asociados a linfocitos Th, Tc y B (CD4, CD8 y CD19 respectivamente), así como una reducción en el contenido de marcadores de células dendríticas y monocitos pro-inflamatorios (CD86 y CD16 respectivamente) (Tabla 40). Varios estudios demostraron que el aumento de la activación,

estrés metabólico, señales inflamatorias y/o estrés oxidativo incrementa el número de VE<sup>231,232</sup>, por lo que el aumento del contenido en marcadores de linfocitos Th, Tc y B revela que estos tipos celulares estarían alterados en la patología. Estas alteraciones concuerdan con el aumento en la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y en el porcentaje de linfocitos B totales en sangre periférica en pacientes con EHM, descritos en este estudio, así como con un aumento del estrés oxidativo en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> y B en pacientes con EHM como se observó en estudios anteriores del nuestro grupo<sup>233,234</sup>. El análisis de correlación mostró una correlación positiva entre el porcentaje de linfocitos B totales y el contenido proteico de CD19 en VE, reforzando la idea de que en pacientes con EHM este tipo celular estaría alterado y estarían liberando mayor cantidad de VE al plasma.

También se analizó el contenido de marcadores de células del SNC, como L1CAM y CD13, marcadores de neuronas y microglía respectivamente. Se observó un aumento en las VE derivadas de neuronas en plasma de pacientes con EHM (Tabla 40), aumento que sería un indicador de alteraciones en estos tipos celulares<sup>147</sup>. En relación con este aumento, Lachenal *et al.*<sup>235</sup> demostraron que la liberación de VE por parte de las neuronas estaría regulada por la actividad glutamatérgica, en concreto por la activación de los receptores AMPA y NMDA. Estudios en modelos animales de hiperamonemia demostraron que la actividad glutamatérgica y los receptores AMPA y NMDA estaban alterados<sup>236,237</sup>, por lo que el aumento del contenido de L1CAM en VE aisladas de plasma de pacientes con EHM se podría relacionar con la activación tónica de los receptores NMDA, inducido por la hiperamonemia presente en estos pacientes. El análisis de las VE derivadas de neuronas aisladas a partir plasma se ha propuesto como una buena herramienta para el diagnóstico de patologías del SNC, ya que se obtienen con un método poco invasivo y que su contenido refleja el estado fisiológico de las neuronas que las generan<sup>118,119,147,217</sup>. Futuros estudios se pueden centrar en analizar el contenido de VE derivadas de neuronas para evaluar si puede ser un buen biomarcador de las alteraciones en la neurotransmisión y deterioro cognitivo asociadas a la EHM.

### **4.3. Caracterización de los cambios en el contenido proteico de vesículas extracelulares de plasma de pacientes con encefalopatía hepática mínima y su efecto sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

La acción de las VE sobre la célula diana puede producirse mediante 1) proteínas que actúan intracelularmente al fusionarse con la membrana de la célula diana y/o 2) ligandos presentes en la superficie de las VE que actuarían sobre los receptores de la célula diana<sup>116,223,224</sup>. Por ello, cambios en el contenido proteico podrían dar lugar a alteraciones de la fisiología de la célula diana. Las VE de pacientes con EHM presentan mayor contenido de TNF- $\alpha$ , ADAM17, MHC II, CD74 y glutamina sintetasa, así como un menor contenido en TGF- $\beta$  (Tabla 40).

Para evaluar cómo los cambios en la composición de las VE pueden modular la función del sistema inmunitario en la EHM, se realizaron cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sujetos control adicionando VE aisladas de plasma de sujetos control, sin EHM y con EHM, para analizar posteriormente el patrón de citocinas liberadas y la diferenciación a fenotipos efectores de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (ver apartado 13 de Materiales y Métodos). La adición de VE procedentes de pacientes con EHM induce la síntesis y liberación de las citocinas pro-inflamatorias IL-17 e IL-21, así como un aumento en la citocina anti-inflamatoria TGF- $\beta$  por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en cultivo. Se detectó también un aumento en la expresión del factor de transcripción FOXP3, relacionado con linfocitos Tregs (Tabla 41). Por otra parte, tras la adición de VE procedentes de sujetos control y sin EHM, se observó una disminución en la síntesis y liberación de TNF- $\alpha$  y CCL20 por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y una disminución de la expresión del factor de transcripción BCL6 característico de los linfocitos Thf, lo que se traduce en que las células cultivadas con VE de pacientes con EHM liberaban mayor cantidad de TNF- $\alpha$  y CCL20 y tenían una mayor expresión de BCL6 (Tabla 41).

**Tabla 41. Efectos de la adición de VE aisladas de plasma de sujetos sanos, pacientes sin EHM y pacientes con EHM sobre cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de controles.**

		+VE Control	+VE Sin EHM	+VE EHM
<b>Nivel de citocinas a 24 horas</b>	IL-17	↓	-	↑
	IL-21	-	-	↑
	IL-22	-	-	↓
	TNF- $\alpha$	↓	↓	↓
	TGF- $\beta$	↑	-	-
<b>Nivel de citocinas a 5 días</b>	IL-17	-	-	↑
	IL-21	-	-	-
	IL-22	-	-	-
	TNF- $\alpha$	↓	↓	-
	TGF- $\beta$	-	-	↑
	IL-1 $\beta$	-	-	↓
	CCL20	↓	↓	-
<b>Expresión de factores de transcripción a 5 días</b>	TBX21	↓	-	-
	GATA3	-	-	-
	RORC	-	-	-
	BCL6	↓	↓	-
	AHR	↓	-	-
	FOXP3	-	↑	↑

Los efectos mostrados están referidos a la condición basal sin la adición de VE. ↑: aumento significativo, ↓: disminución significativa, -: sin diferencias significativas.

Las VE de pacientes con EHM contienen un mayor contenido de TNF- $\alpha$  y ADAM17 (Tabla 40). ADAM17 es una metaloproteasa capaz de desprender el TNF- $\alpha$  unido a la membrana a su forma soluble, más bioactiva<sup>164,238</sup>. El aumento de TNF- $\alpha$  y de ADAM17, así como un menor contenido de la molécula anti-inflamatoria TGF- $\beta$ , hace que las VE de pacientes con EHM favorezcan un ambiente pro-inflamatorio. Varios estudios demuestran que el TNF- $\alpha$  contenido en VE es capaz de activar vías de transcripción de citocinas pro-inflamatorias como NF $\kappa$ B y Akt<sup>138,239,240</sup>, así como mantener la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> e inducir la liberación de otras citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-21<sup>138</sup>. De forma similar, el TNF- $\alpha$  y las moléculas

## Discusión

que potencian su función, contenidas en las VE de pacientes con EHM activarían receptores y vías de transducción en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, incrementando la producción de citocinas pro-inflamatorias en los cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Las VE de pacientes con EHM también presentaban un incremento en el contenido de MHC II y CD74 (Tabla 40), moléculas implicadas en la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y su activación. El MHC II se expresa tanto en linfocitos B como en células dendríticas, así como en las VE que estas generan. Dado que en VE de pacientes con EHM el marcador CD19 asociado a linfocitos B está aumentado y el marcador CD86 asociado a células dendríticas está disminuido (Tabla 40), la fuente principal del MHC II en estos pacientes serían los linfocitos B. El MHC II asociado a VE es capaz de estimular la producción de citocinas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> con un umbral de activación bajo, es decir, células que necesitan poca interacción con el MHC II para conseguir una activación total<sup>125,241</sup>. El CD74 es una chaperona que se expresa en la superficie de células que co-expresan el MHC II, como linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, etc. La molécula de CD74 está implicada en el tráfico del complejo MHC II-antígeno desde el retículo endoplásmico hasta la superficie de la membrana plasmática<sup>242-245</sup>, favoreciendo también su presencia en la superficie de las VE. Por otra parte, el CD74 también actúa como receptor para el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, del inglés *Macrophage migration Inhibitory Factor*), citocina que también se expresa por parte de los linfocitos T<sup>246</sup>, que al unirse a su receptor activa vías de transducción vía NF- $\kappa$ B y estimula la secreción de las citocinas y factores inflamatorios<sup>247-250</sup>. Tras la fusión de las VE con la célula diana, el CD74 contenido en su superficie se puede mantener estable en la superficie de la célula diana, actuando como receptor volviendo a la célula diana más sensible al ligando MIF y provocando un aumento en la liberación de citocinas pro-inflamatorias en estas células.

El aumento en el contenido de MHC II y CD74 en VE de pacientes con EHM contribuirían a la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, a su diferenciación a fenotipos efectoros y al aumento en la liberación de citocinas pro-inflamatorias que se observa en cultivos *in vitro*.

Las VE de pacientes con EHM inducen un aumento en la expresión del factor de transcripción FOXP3, característico de los linfocitos Tregs, y en consecuencia un aumento del TGF- $\beta$  liberado al medio (Tabla 41). Las VE de sujetos control inducen una reducción en la expresión de los factores de transcripción TBX21, BCL6 y AHR (Tabla 41), característicos de linfocitos Th1, Thf y Th22; este efecto puede estar mediado por el TGF- $\beta$  contenido en las VE, el cual



está más concentrado en VE procedentes de sujetos control y de pacientes sin EHM que en VE de pacientes con EHM (Tabla 40). Álvarez *et al.*<sup>139</sup> demostraron que las VE derivadas de células mesenquimales eran capaces de inhibir la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a fenotipos efectores mediante el TGF-β contenido en ellas. En dichos experimentos la estimulación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> generaba fenotipos efectores, mientras que si estos se cultivaban junto a VE de células mesenquimales se inhibía este efecto. El tratamiento de estas VE con bloqueantes del TGF-β previo a la adición a los cultivos revertía el efecto de estas vesículas sobre la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, confirmando el papel del TGF-β en la inhibición de los fenotipos efectores en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. El mayor contenido en TGF-β en VE de sujetos control media la reducción en la generación de los fenotipos efectores Th1, Thf y Th22, así como la reducción de Thf en células cultivadas con VE de pacientes sin EHM. El contenido menor de TGF-β en VE de pacientes con EHM reduce la capacidad inhibitoria en la diferenciación a fenotipos efectores en cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, permitiendo que estas células se diferencien a fenotipos efectores influenciadas por otros componentes presentes en las VE de pacientes con EHM.

En resumen, observamos que existen cambios en la procedencia y el contenido proteico en las VE de pacientes con EHM con respecto a las VE aisladas de sujetos control o de pacientes sin EHM. Estos cambios podrían ser los responsables de los efectos observados en cultivos *in vitro* de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los principales cambios observados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> cultivados con VE de pacientes con EHM son el incremento de las citocinas IL-17, IL-21, TNF-α y CCL20 y del factor de transcripción BCL6 asociado a Thf en comparación a cultivos celulares con adición de VE de sujetos control o pacientes sin EHM. Estos cambios son algunos de los que se observan en pacientes con EHM *in vivo*<sup>112</sup>, lo que sugiere que las VE pueden jugar un papel importante en la modulación e inducción de los cambios en el sistema inmunitario asociados a la EHM.

## **5. Valor diagnóstico de parámetros del inmunofenotipo y vesículas extracelulares en la encefalopatía hepática mínima**

Para estudiar el valor diagnóstico de los diferentes parámetros se realizó un análisis de curvas ROC utilizando las variables estudiadas en el inmunofenotipado de linfocitos B y T y la carga proteica en VE. Los parámetros que aportan un valor diagnóstico mejor son (ordenados de mayor a menor AUC): el cociente Th1/Th2, el contenido en CD8 y CD86 en VE y el porcentaje de linfocitos B. A pesar de ser los parámetros que mejor diagnostican la EHM en este estudio, su AUC obtiene valores inferiores a 0,8, con una sensibilidad y especificidad inferior al 80%, lo cual no los hace óptimos para su utilización como biomarcador temprano de la enfermedad. A pesar de que estos parámetros no están listos para ser utilizados como un biomarcador útil para el diagnóstico temprano de la EHM, nuestro estudio sí los sitúa en el punto de mira para futuros estudios que puedan contribuir a comprender mejor su papel en la patología y que aumenten el tamaño muestral para mejorar estos análisis.





## **VIII. CONCLUSIONES**



1. Las funciones cognitivas y ejecutivas de los pacientes con EHM están alteradas respecto a los pacientes sin EHM y sujetos control.
2. Los pacientes con EHM se caracterizan por un aumento de linfocitos B totales, que podría deberse a los niveles aumentados de BAFF en plasma, y una disminución en la capacidad de generar fenotipos efectores de linfocitos B.
3. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales de pacientes con EHM están más activados. Además, presentan mayor proporción de fenotipos Th2, Th22, Th17 y Th9, los cuales favorecen la inflamación periférica y la infiltración linfocitaria en cerebro, contribuyendo a la inducción de las alteraciones neurológicas en pacientes con EHM.
4. El aumento de la expresión de TLR4 y CCR2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM promovería mayor respuesta inflamatoria en dichos linfocitos y su infiltración en el cerebro de pacientes con EHM.
5. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con EHM contienen menor cantidad de TTP y A20, proteínas que regulan negativamente la expresión de citocinas pro-inflamatorias. Esta disminución en el contenido de TTP y A20 contribuye al aumento de los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en plasma de pacientes con EHM.
6. Los pacientes con EHM presentan una mayor proporción de VE procedentes de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y neuronas, lo que indicaría una alteración en estos tipos celulares.
7. El aumento del contenido de MHC II y CD74 en VE de pacientes con EHM favorece la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en dichos pacientes.
8. Las VE de pacientes con EHM presentan un contenido menor en TGF- $\beta$ , así como un contenido mayor en TNF- $\alpha$  y ADAM17, fomentando un ambiente pro-inflamatorio.
9. Las VE de pacientes con EHM son capaces de modular la función de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en cultivo:
  - Aumentando la liberación de IL-17 e IL-21.
  - Induciendo un aumento relativo de TNF- $\alpha$  y CCL20.
  - Promoviendo la activación de los linfocitos Th17.
  - Favoreciendo la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia fenotipos Thf y Tregs.

Estos efectos son similares a los que se observan en sangre periférica de pacientes con EHM, por lo que las VE jugarían un papel en la modulación del sistema inmunitario de dichos pacientes.





## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



1. Trefths, E., Gannon, M. & Wasserman, D. H. The liver. *Current Biology* **27**, R1147–R1151 (2017).
2. Schuppan, D. & Afdhal, N. H. Liver cirrhosis. *The Lancet* **371**, 838–851 (2008).
3. Tsochatzis, E. A., Bosch, J. & Burroughs, A. K. Liver cirrhosis. *The Lancet* **383**, 1749–1761 (2014).
4. Karimzadeh Toosi, A. E. Liver Fibrosis: Causes and Methods of Assessment, A Review. *Romanian Journal Of Internal Medicine* **53**, 304–314 (2015).
5. Vilstrup, H. *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* **60**, 715–735 (2014).
6. Ridola, L. The burden of minimal hepatic encephalopathy: from diagnosis to therapeutic strategies. *Ann Gastroenterol* **31**, 151-164 (2018).
7. Amodio, P., Montagnese, S., Gatta, A. & Morgan, M. Y. Characteristics of Minimal Hepatic Encephalopathy. *Metab Brain Dis* **19**, 253–267 (2004).
8. Wiltfang, J., Nolte, W., Weißenborn, K., Kornhuber, J. & Rüter, E. Psychiatric aspects of portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **13**, 379–389 (1998).
9. Nardone, R. *et al.* Minimal hepatic encephalopathy: A review. *Neurosci Res* **111**, 1–12 (2016).
10. Hartmann, I. J. C. *et al.* The prognostic significance of subclinical hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* **95**, 2029–2034 (2000).
11. Romero-Gomez, M., Boza, F., García-Valdecasas, M. S., García, E. & Aguilar-Reina, J. Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* **96**, 2718–2723 (2001).
12. Ampuero, J. *et al.* Minimal Hepatic Encephalopathy and Critical Flicker Frequency Are Associated With Survival of Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology* **149**, 1483–1489 (2015).
13. Shalev, A. Y. Posttraumatic Stress Disorder and Stress-Related Disorders. *Psychiatric Clinics of North America* **32**, 687–704 (2009).
14. Weissenborn, K. *et al.* Attention, Memory, and Cognitive Function in Hepatic Encephalopathy. *Metab Brain Dis* **20**, 359–367 (2005).
15. Amodio, P. *et al.* Attention Dysfunction in Cirrhotic Patients: An Inquiry on the Role of Executive Control, Attention Orienting and Focusing. *Metab Brain Dis* **20**, 115–127 (2005).
16. Felipo, V. *et al.* Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology* **55**, 530–539 (2012).
17. Groeneweg, M. *et al.* Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* **28**, 45–49 (1998).

## Bibliografia

18. Agrawal, S., Umopathy, S. & Dhiman, R. K. Minimal Hepatic Encephalopathy Impairs Quality of Life. *J Clin Exp Hepatol* **5**, S42–S48 (2015).
19. Ferenci, P. *et al.* Hepatic encephalopathy-Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* **35**, 716–721 (2002).
20. Román, E. *et al.* Minimal Hepatic Encephalopathy Is Associated With Falls. *American Journal of Gastroenterology* **106**, 476–482 (2011).
21. Stepanova, M., Mishra, A., Venkatesan, C. & Younossi, Z. M. In-Hospital Mortality and Economic Burden Associated With Hepatic Encephalopathy in the United States From 2005 to 2009. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **10**, 1034-1041.e1 (2012).
22. Bajaj, J. S. *et al.* Review article: the design of clinical trials in hepatic encephalopathy - an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement. *Aliment Pharmacol Ther* **33**, 739–747 (2011).
23. Felipo, V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci* **14**, 851–858 (2013).
24. Butterworth, R. F. Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology. *Drugs* **79**, 17–21 (2019).
25. Aldridge, D. R., Tranah, E. J. & Shawcross, D. L. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: Role of Ammonia and Systemic Inflammation. *J Clin Exp Hepatol* **5**, S7–S20 (2015).
26. Montoliu, C. *et al.* IL-6 and IL-18 in Blood May Discriminate Cirrhotic Patients With and Without Minimal Hepatic Encephalopathy. *J Clin Gastroenterol* **43**, 272–279 (2009).
27. Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I. & Oliven, A. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver International* **24**, 110–116 (2004).
28. Shawcross, D. L. *et al.* Infection and systemic inflammation, not ammonia, are associated with Grade 3/4 hepatic encephalopathy, but not mortality in cirrhosis. *J Hepatol* **54**, 640–649 (2011).
29. Felipo, V. *et al.* Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **27**, 51–58 (2012).
30. Montoliu, C., Llansola, M. & Felipo, V. Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Neuroimmunol Neuroinflamm* **2**, 138–144 (2015).
31. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, (2010).
32. Tomar, N. & De, R. K. A Brief Outline of the Immune System. *Methods Mol Biol* **1184**, 3–12 (2014).

33. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *The Lancet* **357**, 1777–1789 (2001).
34. Salmond, R. J., Filby, A., Qureshi, I., Caserta, S. & Zamoyska, R. T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev* **228**, 9–22 (2009).
35. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Heterogeneity of CD4<sup>+</sup> memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* **39**, 2076–2082 (2009).
36. Zhu, X. & Zhu, J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci* **21**, 8011 (2020).
37. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol* **28**, 445–489 (2010).
38. Olson, N. C., Sallam, R., Doyle, M. F., Tracy, R. P. & Huber, S. A. T Helper Cell Polarization in Healthy People: Implications for Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Transl Res* **6**, 772–786 (2013).
39. Stockinger, B. & Omenetti, S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol* **17**, 535–544 (2017).
40. Dölff, S., Witzke, O. & Wilde, B. Th17 cells in renal inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* **18**, 129–136 (2019).
41. Constantinescu, C. & Gran, B. The essential role of t cells in multiple sclerosis: A reappraisal. *Biomed J* **37**, 34 (2014).
42. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* **453**, 1051–1057 (2008).
43. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
44. Ivanov, I. I. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T Helper Cells. *Cell* **126**, 1121–1133 (2006).
45. Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* **10**, 857–863 (2009).
46. Tian, T. *et al.* Increased Th22 cells as well as Th17 cells in patients with adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clinica Chimica Acta* **426**, 108–113 (2013).
47. Aujla, S. J. *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* **14**, 275–281 (2008).
48. Zhang, L. *et al.* Elevated Frequencies of Circulating Th22 Cell in Addition to Th17 Cell and Th17/Th1 Cell in Patients with Acute Coronary Syndrome. *PLoS One* **8**, e71466 (2013).

## Bibliografia

49. Eyerich, S. *et al.* Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *Journal of Clinical Investigation* **119**, 3573-3585 (2009).
50. Sun, D. *et al.* Th22 cells control colon tumorigenesis through STAT3 and Polycomb Repression complex 2 signaling. *Oncoimmunology* **5**, e1082704 (2016).
51. Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K. & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells. *Nat Immunol* **10**, 864–871 (2009).
52. Chang, H.-C. *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* **11**, 527–534 (2010).
53. Staudt, V. *et al.* Interferon-Regulatory Factor 4 Is Essential for the Developmental Program of T Helper 9 Cells. *Immunity* **33**, 192–202 (2010).
54. Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9–producing subset. *Nat Immunol* **9**, 1341–1346 (2008).
55. Nowak, E. C. *et al.* IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1653–1660 (2009).
56. Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. & Kuchroo, V. K. Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. *The Journal of Immunology* **183**, 7169–7177 (2009).
57. Sakaguchi, S. *et al.* Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**, 8–27 (2006).
58. Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* **30**, 626–635 (2009).
59. Zorn, E. *et al.* IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* **108**, 1571–1579 (2006).
60. Burchill, M. A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B. R. & Farrar, M. A. IL-2 Receptor  $\beta$ -Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* **178**, 280–290 (2007).
61. Takimoto, T. *et al.* Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- $\beta$ -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. *The Journal of Immunology* **185**, 842–855 (2010).
62. Mu, L. *et al.* Disequilibrium of T helper type 1, 2 and 17 cells and regulatory T cells during the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Immunology* **128**, e826–e836 (2009).
63. Fong, Y. *et al.* Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *Journal of Experimental Medicine* **170**, 1627–1633 (1989).

64. Gordon, C. & Wofsy, D. Effects of recombinant murine tumor necrosis factor-alpha on immune function. *J Immunol* **144**, 1753–8 (1990).
65. Yokota, S., Geppert, T. D. & Lipsky, P. E. Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **140**, 531–6 (1988).
66. Doukas, J. & Pober, J. S. IFN-gamma enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *J Immunol* **145**, 1727–33 (1990).
67. Chabaud, M. *et al.* Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* **42**, 963–970 (1999).
68. Wong, C. K., Ho, C. Y., Li, E. & Lam, C. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **9**, 589–593 (2000).
69. Lock, C. *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* **8**, 500–508 (2002).
70. Kebir, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* **13**, 1173–1175 (2007).
71. Balasa, R. *et al.* The action of TH17 cells on blood brain barrier in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Hum Immunol* **81**, 237–243 (2020).
72. Huppert, J. *et al.* Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *The FASEB Journal* **24**, 1023–1034 (2010).
73. Balzano, T. *et al.* The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Sci Rep* **8**, 3004 (2018).
74. Brand, S. *et al.* IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**, G827–G838 (2006).
75. Lo, Y.-H. *et al.* Serum IL-22 correlates with psoriatic severity and serum IL-6 correlates with susceptibility to phototherapy. *J Dermatol Sci* **58**, 225–227 (2010).
76. Zhang, L. *et al.* Elevated Th22 Cells Correlated with Th17 Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Clin Immunol* **31**, 606–614 (2011).
77. Gattorno, M. *et al.* The pattern of response to anti-interleukin-1 treatment distinguishes two subsets of patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* **58**, 1505–1515 (2008).
78. Anka Idrissi, D. *et al.* IL-1 and CD40/CD40L platelet complex: elements of induction of Crohn's disease and new therapeutic targets. *Arch Pharm Res* **44**, 117–132 (2021).
79. Williams, J. L., Holman, D. W. & Klein, R. S. Chemokines in the balance: maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers. *Front Cell Neurosci* **8**, (2014).

## Bibliografia

80. Reboldi, A. *et al.* C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* **10**, 514–523 (2009).
81. Arima, Y. *et al.* Regional Neural Activation Defines a Gateway for Autoreactive T Cells to Cross the Blood-Brain Barrier. *Cell* **148**, 447–457 (2012).
82. Zhou, L. *et al.* TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function. *Nature* **453**, 236–240 (2008).
83. Damgaard, C. K. & Lykke-Andersen, J. *RNA and Cancer*. vol. 158 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
84. Rodríguez-Gómez, G. *et al.* Tristetraprolin: A cytosolic regulator of mRNA turnover moonlighting as transcriptional corepressor of gene expression. *Mol Genet Metab* **133**, 137–147 (2021).
85. Lai, W. S. *et al.* Evidence that Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA. *Mol Cell Biol* **19**, 4311–4323 (1999).
86. Carballo, E., Lai, W. S. & Blackshear, P. J. Feedback Inhibition of Macrophage Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production by Tristetraprolin. *Science (1979)* **281**, 1001–1005 (1998).
87. Ogilvie, R. L. *et al.* Tristetraprolin Down-Regulates *IL-2* Gene Expression through AU-Rich Element-Mediated mRNA Decay. *The Journal of Immunology* **174**, 953–961 (2005).
88. Ogilvie, R. L. *et al.* Tristetraprolin Mediates Interferon- $\gamma$  mRNA Decay. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 11216–11223 (2009).
89. Lee, H. H. *et al.* Tristetraprolin down-regulates IL-17 through mRNA destabilization. *FEBS Lett* **586**, 41–46 (2012).
90. van Tubergen, E. A. *et al.* Inactivation or Loss of TTP Promotes Invasion in Head and Neck Cancer via Transcript Stabilization and Secretion of MMP9, MMP2, and IL-6. *Clinical Cancer Research* **19**, 1169–1179 (2013).
91. Shembade, N., Ma, A. & Harhaj, E. W. Inhibition of NF- $\kappa$ B Signaling by A20 Through Disruption of Ubiquitin Enzyme Complexes. *Science (1979)* **327**, 1135–1139 (2010).
92. Ma, A. & Malynn, B. A. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat Rev Immunol* **12**, 774–785 (2012).
93. Coornaert, B., Carpentier, I. & Beyaert, R. A20: Central Gatekeeper in Inflammation and Immunity. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 8217–8221 (2009).
94. Vereecke, L., Beyaert, R. & van Loo, G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol* **30**, 383–391 (2009).
95. Lin, S.-C. *et al.* Molecular Basis for the Unique Deubiquitinating Activity of the NF- $\kappa$ B Inhibitor A20. *J Mol Biol* **376**, 526–540 (2008).



96. Wertz, I. E. *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- $\kappa$ B signalling. *Nature* **430**, 694–699 (2004).
97. Bosanac, I. *et al.* Ubiquitin Binding to A20 ZnF4 Is Required for Modulation of NF- $\kappa$ B Signaling. *Mol Cell* **40**, 548–557 (2010).
98. Skaug, B. *et al.* Direct, Noncatalytic Mechanism of IKK Inhibition by A20. *Mol Cell* **44**, 559–571 (2011).
99. Musone, S. L. *et al.* Sequencing of TNFAIP3 and association of variants with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun* **12**, 176–182 (2011).
100. Graham, R. R. *et al.* Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **40**, 1059–1061 (2008).
101. Musone, S. L. *et al.* Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **40**, 1062–1064 (2008).
102. Plenge, R. M. *et al.* Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* **39**, 1477–1482 (2007).
103. Elsby, L. M. *et al.* Functional evaluation of TNFAIP3 (A20) in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **28**, 708–14 (2010).
104. Nair, R. P. *et al.* Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF- $\kappa$ B pathways. *Nat Genet* **41**, 199–204 (2009).
105. Genetic Analysis of Psoriasis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2 *et al.* A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet* **42**, 985–90 (2010).
106. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) *et al.* Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* **45**, 1353–60 (2013).
107. Gilli, F. Loss of Braking Signals During Inflammation. *Arch Neurol* **68**, 879 (2011).
108. Boone, D. L. *et al.* The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* **5**, 1052–1060 (2004).
109. Chu, Y. *et al.* B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood* **117**, 2227–2236 (2011).
110. Perga, S. *et al.* A20 in Multiple Sclerosis and Parkinson’s Disease: Clue to a Common Dysregulation of Anti-Inflammatory Pathways? *Neurotox Res* **32**, 1–7 (2017).
111. Berard, M. & Tough, D. F. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology* **106**, 127–138 (2002).
112. Mangas-Losada, A. *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* **7**, 6683 (2017).

113. Jan, A., Rahman, S., Khan, S., Tasduq, S. & Choi, I. Biology, Pathophysiological Role, and Clinical Implications of Exosomes: A Critical Appraisal. *Cells* **8**, 99 (2019).
114. Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (1979)* **367**, (2020).
115. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G. & Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* **21**, 9–17 (2019).
116. Teng, F. & Fussenegger, M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Advanced Science* **8**, 2003505 (2021).
117. Feng, Z. *et al.* Epithelium- and endothelium-derived exosomes regulate the alveolar macrophages by targeting RGS1 mediated calcium signaling-dependent immune response. *Cell Death Differ* **28**, 2238–2256 (2021).
118. Sun, B., Dalvi, P., Abadjian, L., Tang, N. & Pulliam, L. Blood neuron-derived exosomes as biomarkers of cognitive impairment in HIV. *AIDS* **31**, F9–F17 (2017).
119. Pulliam, L., Sun, B., Mustapic, M., Chawla, S. & Kapogiannis, D. Plasma neuronal exosomes serve as biomarkers of cognitive impairment in HIV infection and Alzheimer’s disease. *J Neurovirol* **25**, 702–709 (2019).
120. la Salvia, S. *et al.* T cell-derived extracellular vesicles are elevated in essential HTN. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **319**, F868–F875 (2020).
121. Puhm, F., Boilard, E. & Machlus, K. R. Platelet Extracellular Vesicles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **13**, 1026386 (2020).
122. Nolte-‘t Hoen, E. N. M., Buschow, S. I., Anderton, S. M., Stoorvogel, W. & Wauben, M. H. M. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* **113**, 1977–1981 (2009).
123. Muntasell, A., Berger, A. C. & Roche, P. A. T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J* **26**, 4263–4272 (2007).
124. Blanchard, N. *et al.* TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/ζ Complex. *The Journal of Immunology* **168**, 3235–3241 (2002).
125. Wahlund, C. J. E. *et al.* Exosomes from antigen-pulsed dendritic cells induce stronger antigen-specific immune responses than microvesicles in vivo. *Sci Rep* **7**, 17095 (2017).
126. Yin, W., Ouyang, S., Li, Y., Xiao, B. & Yang, H. Immature Dendritic Cell-Derived Exosomes: a Promise Subcellular Vaccine for Autoimmunity. *Inflammation* **36**, 232–240 (2013).
127. Vincent-Schneider, H. Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *Int Immunol* **14**, 713–722 (2002).
128. Théry, C. *et al.* Indirect activation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* **3**, 1156–1162 (2002).

129. Admyre, C., Johansson, S. M., Paulie, S. & Gabrielsson, S. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol* **36**, 1772–81 (2006).
130. Montecalvo, A. *et al.* Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition. *J Immunol* **180**, 3081–90 (2008).
131. Mallegol, J. *et al.* T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology* **132**, 1866–76 (2007).
132. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**, 581–593 (2009).
133. Zhang, Y. *et al.* Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Mol Cell* **39**, 133–144 (2010).
134. Gibbins, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* **11**, 1143–1149 (2009).
135. Batagov, A. O. & Kurochkin, I. v. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct* **8**, 12 (2013).
136. Zuccato, E. *et al.* Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by mono-ubiquitylation and phosphorylation. *J Cell Sci* **120**, 191–9 (2007).
137. Robbins, P. D. & Morelli, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* **14**, 195–208 (2014).
138. Zhang, H.-G. *et al.* A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *J Immunol* **176**, 7385–93 (2006).
139. Álvarez, V. *et al.* The immunomodulatory activity of extracellular vesicles derived from endometrial mesenchymal stem cells on CD4+ T cells is partially mediated by TGFbeta. *J Tissue Eng Regen Med* **12**, 2088-2098 (2018).
140. Gupta, A. & Pulliam, L. Exosomes as mediators of neuroinflammation. *J Neuroinflammation* **11**, 68 (2014).
141. Alvarez-Erviti, L. *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* **29**, 341–345 (2011).
142. Chen, C. C. *et al.* Elucidation of Exosome Migration Across the Blood–Brain Barrier Model In Vitro. *Cell Mol Bioeng* **9**, 509–529 (2016).
143. Banks, W. A. *et al.* Transport of Extracellular Vesicles across the Blood-Brain Barrier: Brain Pharmacokinetics and Effects of Inflammation. *Int J Mol Sci* **21**, 4407 (2020).
144. Izquierdo-Altarejos, P., Cabrera-Pastor, A., Gonzalez-King, H., Montoliu, C. & Felipe, V. Extracellular Vesicles from Hyperammonemic Rats Induce Neuroinflammation and Motor Incoordination in Control Rats. *Cells* **9**, 572 (2020).

## Bibliografía

145. Felipo, V., Minana, M.-D. & Grisolia, S. Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *Eur J Biochem* **176**, 567–571 (1988).
146. Cabrera-Pastor, A. *et al.* Increasing extracellular cGMP in cerebellum in vivo reduces neuroinflammation, GABAergic tone and motor in-coordination in hyperammonemic rats. *Brain Behav Immun* **69**, 386–398 (2018).
147. Bang, C. & Thum, T. Exosomes: New players in cell–cell communication. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 2060–2064 (2012).
148. Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* **18**, 997–1006 (2008).
149. Weissenborn, K., Ennen, J. C., Schomerus, H., Rückert, N. & Hecker, H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* **34**, 768–773 (2001).
150. Romero Gómez, M. *et al.* Tablas de normalidad de la población española para los tests psicométricos utilizados en el diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima. *Med Clin (Barc)* **127**, 246–249 (2006).
151. Stroop, J. R. Studies of interference in serial verbal reactions. *J Exp Psychol* **18**, 643–662 (1935).
152. Stirling, N. Stroop Interference: An Input and an Output Phenomenon. *Quarterly Journal of Experimental Psychology* **31**, 121–132 (1979).
153. Glaser, M. O. & Glaser, W. R. Time course analysis of the Stroop phenomenon. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* **8**, 875–894 (1982).
154. Scarpina, F. & Tagini, S. The Stroop Color and Word Test. *Front Psychol* **8**, (2017).
155. Golden, C. J., Ruiz-Fernandez, B., Luque, T. & Sánchez Sánchez, F. *Stroop, test de colores y palabras*. (TEA, 2020).
156. Smith, A. The Symbol Digit Modalities Test: A neuropsychologic test for economic screening of learning and other cerebral disorders. *Learning Disorders*, **3**, 83–91, (1968).
157. Egeland, J. Measuring Working Memory With Digit Span and the Letter-Number Sequencing Subtests From the WAIS-IV: Too Low Manipulation Load and Risk for Underestimating Modality Effects. in *Applied Neuropsychology: Adult* vol. 22 445–451 (2015).
158. Wechsler, D. *Manual for the Wechsler Adult Intelligence Test*. (Psychological Corporation, 1955).
159. Bates, M. E. & Lemay, E. P. The d2 Test of Attention: Construct validity and extensions in scoring techniques. in *Journal of the International Neuropsychological Society* vol. 10 392–400 (2004).
160. Brickenkamp, R. & Zillmer, E. A. D2 Test of Attention. in (1998).
161. Brickenkamp, R. & Seisdedos Cubero, N. *D2, test de atención : manual*. (TEA, 2012).

162. Yela, M. Un test de rapidez motora. *Revista de Psicología General y Aplicada* **10**, 137–148 (1955).
163. Yela, M. & López Ladrón, L. Un test de coordinación visomotora. *Revista de Psicología General y Aplicada* **10**, 409–421 (1995).
164. Düsterhöft, S., Lokau, J. & Garbers, C. The metalloprotease ADAM17 in inflammation and cancer. *Pathol Res Pract* **215**, 152410 (2019).
165. Gairing, S. J. *et al.* Evaluation of IL-6 for Stepwise Diagnosis of Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients With Liver Cirrhosis. *Hepatol Commun* **6**, 1113–1122 (2022).
166. Kaps, L. *et al.* Validation of EncephalApp\_Stroop as screening tool for the detection of minimal hepatic encephalopathy in German patients with liver cirrhosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **46**, 101873 (2022).
167. Giménez-Garzó, C. *et al.* The PHES battery does not detect all cirrhotic patients with early neurological deficits, which are different in different patients. *PLoS One* **12**, e0171211 (2017).
168. Felipo, V. *et al.* Serum nitrotyrosine and psychometric tests as indicators of impaired fitness to drive in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *Liver International* **33**, 1478–1489 (2013).
169. Bajaj, J. S. *et al.* Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: The reality beyond the driving test. *Hepatology* **50**, 1175–1183 (2009).
170. Wein, C., Koch, H., Popp, B., Oehler, G. & Schauder, P. Minimal hepatic encephalopathy impairs fitness to drive. *Hepatology* **39**, 739–745 (2004).
171. Bajaj, J. S., Pinkerton, S. D., Sanyal, A. J. & Heuman, D. M. Diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy to prevent motor vehicle accidents: A cost-effectiveness analysis. *Hepatology* **55**, 1164–1171 (2012).
172. Kara, E. E. *et al.* Tailored Immune Responses: Novel Effector Helper T Cell Subsets in Protective Immunity. *PLoS Pathog* **10**, e1003905 (2014).
173. Grogan, J. L. & Ouyang, W. A role for Th17 cells in the regulation of tertiary lymphoid follicles. *Eur J Immunol* **42**, 2255–2262 (2012).
174. Stohl, W. B lymphocyte stimulator protein levels in systemic lupus erythematosus and other diseases. *Curr Rheumatol Rep* **4**, 345–350 (2002).
175. Noelle, R. J. & Erickson, L. D. Determinations of B Cell Fate in Immunity and Autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* **8**, 1–24 (2004).
176. Mackay, F. The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancers. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 347–354 (2004).
177. Mackay, F. & Browning, J. L. BAFF: A fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 465–475 (2002).

## Bibliografia

178. Do, R. K. G. *et al.* Attenuation of Apoptosis Underlies B Lymphocyte Stimulator Enhancement of Humoral Immune Response. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 953–964 (2000).
179. Krumbholz, M. *et al.* BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *Journal of Experimental Medicine* **201**, 195–200 (2005).
180. Nikbin, B., Bonab, M. M., Khosravi, F. & Talebian, F. Role of B Cells in Pathogenesis of Multiple Sclerosis. in 13–42 (2007). doi:10.1016/S0074-7742(07)79002-5.
181. Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J. L., Rajewsky, K. & Schmidt-Supprian, M. TNF Family Member B Cell-Activating Factor (BAFF) Receptor-Dependent and -Independent Roles for BAFF in B Cell Physiology. *The Journal of Immunology* **173**, 2245–2252 (2004).
182. Kohler, R. E., Caon, A. C., Willenborg, D. O., Clark-Lewis, I. & McColl, S. R. A Role for Macrophage Inflammatory Protein-3 $\alpha$ /CC Chemokine Ligand 20 in Immune Priming During T Cell-Mediated Inflammation of the Central Nervous System. *The Journal of Immunology* **170**, 6298–6306 (2003).
183. Zhong, W. *et al.* Elevated levels of CCR6+ T helper 22 cells correlate with skin and renal impairment in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* **7**, 12962 (2017).
184. Zhang, L. *et al.* Increased Frequencies of Th22 Cells as well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* **7**, e31000 (2012).
185. Reboldi, A. *et al.* C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* **10**, 514–523 (2009).
186. Ye, Z.-J. *et al.* Differentiation and Recruitment of Th9 Cells Stimulated by Pleural Mesothelial Cells in Human Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS One* **7**, e31710 (2012).
187. Korn, T. *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* **448**, 484–487 (2007).
188. Hu, J., Yang, Z., Li, X. & Lu, H. C-C motif chemokine ligand 20 regulates neuroinflammation following spinal cord injury via Th17 cell recruitment. *J Neuroinflammation* **13**, 162 (2016).
189. Smith, K. M. *et al.* Th1 and Th2 CD4+ T Cells Provide Help for B Cell Clonal Expansion and Antibody Synthesis in a Similar Manner In Vivo. *The Journal of Immunology* **165**, 3136–3144 (2000).
190. Elyaman, W. *et al.* IL-9 induces differentiation of T<sub>H</sub> 17 cells and enhances function of FoxP3<sup>+</sup> natural regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 12885–12890 (2009).

191. Zhou, Y. *et al.* IL-9 Promotes Th17 Cell Migration into the Central Nervous System via CC Chemokine Ligand-20 Produced by Astrocytes. *The Journal of Immunology* **186**, 4415–4421 (2011).
192. Chen, Z. *et al.* FOXP3 and ROR $\gamma$ t: Transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol* **11**, 536–542 (2011).
193. CHEN, Y. *et al.* Clinical correlation of peripheral CD4<sup>+</sup>-cell sub-sets, their imbalance and Parkinson's disease. *Mol Med Rep* **12**, 6105–6111 (2015).
194. Xia, M. & Sui, Z. Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opin Ther Pat* **19**, 295–303 (2009).
195. Reale, M., Iarlori, C., Feliciani, C. & Gambi, D. Peripheral Chemokine Receptors, Their Ligands, Cytokines and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **14**, 147–159 (2008).
196. Fantuzzi, L., Tagliamonte, M., Gauzzi, M. C. & Lopalco, L. Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**, 4869–4886 (2019).
197. D'Mello, C., Le, T. & Swain, M. G. Cerebral Microglia Recruit Monocytes into the Brain in Response to Tumor Necrosis Factor Signaling during Peripheral Organ Inflammation. *Journal of Neuroscience* **29**, 2089–2102 (2009).
198. Balzano, T. *et al.* The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Sci Rep* **8**, 3004 (2018).
199. Toubi, E. & Shoenfeld, Y. Toll-like Receptors and their Role in the Development of Autoimmune Diseases. *Autoimmunity* **37**, 183–188 (2004).
200. Qian, C. & Cao, X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci* **1283**, 67–74 (2013).
201. Sandor, F. & Buc, M. Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biol (Praha)* **51**, 188–97 (2005).
202. Gambuzza, M. *et al.* Targeting Toll-like receptors: Emerging therapeutics for multiple sclerosis management. *J Neuroimmunol* **239**, 1–12 (2011).
203. Crowley, T. *et al.* Modulation of TLR3/TLR4 inflammatory signaling by the GABAB receptor agonist baclofen in glia and immune cells: relevance to therapeutic effects in multiple sclerosis. *Front Cell Neurosci* **9**, (2015).
204. Fallarino, F. *et al.* Delineating the Role of Toll-Like Receptors in the Neuroinflammation Model EAE. *Methods Mol Biol* **1390**, 383–411 (2016).
205. Kerfoot, S. M. *et al.* TLR4 Contributes to Disease-Inducing Mechanisms Resulting in Central Nervous System Autoimmune Disease. *The Journal of Immunology* **173**, 7070–7077 (2004).

206. Mellanby, R. J. *et al.* TLR-4 ligation of dendritic cells is sufficient to drive pathogenic T cell function in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* **9**, 248 (2012).
207. Guo, X. *et al.* Regulation of the severity of neuroinflammation and demyelination by TLR-MyD88 pathway. *EMBO Mol Med* **2**, 504–515 (2010).
208. Park, J.-H., Jeong, S.-Y., Choi, A.-J. & Kim, S.-J. Lipopolysaccharide directly stimulates Th17 differentiation in vitro modulating phosphorylation of RelB and NF- $\kappa$ B1. *Immunol Lett* **165**, 10–19 (2015).
209. Qu, X. *et al.* TLR4-RelA-miR-30a signal pathway regulates Th17 differentiation during experimental autoimmune encephalomyelitis development. *J Neuroinflammation* **16**, 183 (2019).
210. Albillos, A., Lario, M. & Álvarez-Mon, M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* **61**, 1385–1396 (2014).
211. Manga-Losada, A. Caracterización de los cambios en el inmunofenotipo asociados a la aparición de la encefalopatía hepática mínima en pacientes cirróticos. (2017).
212. Luo, M. *et al.* Role of gut microbiota in the pathogenesis and therapeutics of minimal hepatic encephalopathy via the gut-liver-brain axis. *World J Gastroenterol* **29**, 144–156 (2023).
213. Johnson, M. O. *et al.* Distinct Regulation of Th17 and Th1 Cell Differentiation by Glutaminase-Dependent Metabolism. *Cell* **175**, 1780-1795.e19 (2018).
214. Cooper, J. T. *et al.* A20 Blocks Endothelial Cell Activation through a NF- $\kappa$ B-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 18068–18073 (1996).
215. Peng, H. *et al.* Tristetraprolin Regulates TH17 Cell Function and Ameliorates DSS-Induced Colitis in Mice. *Front Immunol* **11**, (2020).
216. Gurunathan, S., Kang, M.-H. & Kim, J.-H. A Comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes. *Int J Nanomedicine* **Volume 16**, 1281–1312 (2021).
217. Winston, C. N., Goetzl, E. J., Baker, L. D., Vitiello, M. v. & Rissman, R. A. Growth Hormone-Releasing Hormone Modulation of Neuronal Exosome Biomarkers in Mild Cognitive Impairment. *Journal of Alzheimer's Disease* **66**, 971–981 (2018).
218. Cheng, Y. & Schorey, J. S. Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol* **43**, 3279–3290 (2013).
219. Giri, P. K. & Schorey, J. S. Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in vitro and in vivo. *PLoS One* **3**, e2461 (2008).
220. Wang, J. *et al.* MicroRNA-155 in exosomes secreted from helicobacter pylori infection macrophages immunomodulates inflammatory response. *Am J Transl Res* **8**, 3700–3709 (2016).



221. Ulivieri, C. & Baldari, C. Regulation of T Cell Activation and Differentiation by Extracellular Vesicles and Their Pathogenic Role in Systemic Lupus Erythematosus and Multiple Sclerosis. *Molecules* **22**, 225 (2017).
222. Ridder, K. *et al.* Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of Genetic Information between the Hematopoietic System and the Brain in Response to Inflammation. *PLoS Biol* **12**, e1001874 (2014).
223. Mulcahy, L. A., Pink, R. C. & Carter, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* **3**, 24641 (2014).
224. Svensson, K. J. *et al.* Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem* **288**, 17713–24 (2013).
225. Hunter, M. P. *et al.* Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS One* **3**, e3694 (2008).
226. Peck-Radosavljevic, M. Thrombocytopenia in chronic liver disease. *Liver International* **37**, 778–793 (2017).
227. Saab, S. & Brown, R. S. Management of Thrombocytopenia in Patients with Chronic Liver Disease. *Dig Dis Sci* **64**, 2757–2768 (2019).
228. (Lyn) Greenberg, E. M. & (Sue) Kaled, E. S. Thrombocytopenia. *Crit Care Nurs Clin North Am* **25**, 427–434 (2013).
229. Ballester, M.-P. *et al.* Metabolic syndrome is associated with poor response to rifaximin in minimal hepatic encephalopathy. *Sci Rep* **12**, 2463 (2022).
230. Welsh, J. A., Scorletti, E., Clough, G. F., Englyst, N. A. & Byrne, C. D. Leukocyte extracellular vesicle concentration is inversely associated with liver fibrosis severity in NAFLD. *J Leukoc Biol* **104**, 631–639 (2018).
231. Eguchi, A. *et al.* Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *J Mol Med* **94**, 1241–1253 (2016).
232. Boulanger, C. M., Amabile, N. & Tedgui, A. Circulating Microparticles. *Hypertension* **48**, 180–186 (2006).
233. Giménez-Garzó, C. *et al.* Cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy have increased capacity to eliminate superoxide and peroxynitrite in lymphocytes, associated with cognitive impairment. *Free Radic Res* **52**, 118–133 (2018).
234. Gimenez-Garzó, C. *et al.* Is Cognitive Impairment in Cirrhotic Patients Due to Increased Peroxynitrite and Oxidative Stress? *Antioxid Redox Signal* **22**, 871–877 (2015).
235. Lachenal, G. *et al.* Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and Cellular Neuroscience* **46**, 409–418 (2011).

## Bibliografia

236. Felipo, V., Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M. & Miñana, M. D. Neurotoxicity of ammonia and glutamate: molecular mechanisms and prevention. *Neurotoxicology* **19**, 675–681 (1998).
237. ElMlili, N. *et al.* Chronic hyperammonemia induces tonic activation of NMDA receptors in cerebellum. *J Neurochem* **112**, 1005–1014 (2010).
238. Arenaccio, C. *et al.* Exosomes from Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Cells License Quiescent CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes To Replicate HIV-1 through a Nef- and ADAM17-Dependent Mechanism. *J Virol* **88**, 11529–11539 (2014).
239. Gao, W. *et al.* Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis *via* membrane TNF $\alpha$  mediated NF $\kappa$ B pathway. *J Cell Mol Med* **20**, 2318–2327 (2016).
240. Liu, H. *et al.* Intestinal CD14<sup>+</sup> Macrophages Protect CD4<sup>+</sup> T Cells From Activation-induced Cell Death *via* Exosomal Membrane TNF in Crohn's Disease. *J Crohns Colitis* **14**, 1619–1631 (2020).
241. Admyre, C. *et al.* B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**, 1418–1424 (2007).
242. Su, H., Na, N., Zhang, X. & Zhao, Y. The biological function and significance of CD74 in immune diseases. *Inflammation Research* **66**, 209–216 (2017).
243. Huang, D., Cai, D. T., Chua, R. Y. R., Kemeny, D. M. & Wong, S. H. Nitric-oxide Synthase 2 Interacts with CD74 and Inhibits Its Cleavage by Caspase during Dendritic Cell Development. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1713–1722 (2008).
244. Lamb, C. A. & Cresswell, P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J Immunol* **148**, 3478–82 (1992).
245. Roche, P. A., Marks, M. S. & Cresswell, P. J. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* **354**, 392–394 (1991).
246. Jankauskas, S. S., Wong, D. W. L., Bucala, R., Djudjaj, S. & Boor, P. Evolving complexity of MIF signaling. *Cell Signal* **57**, 76–88 (2019).
247. Leech, M. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: Evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* **42**, 1601–1608 (1999).
248. Liu, Y.-H. *et al.* Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-D Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma by CD74: A Critical Role in Cancer Cell Tumorigenesis. *The Journal of Immunology* **181**, 6584–6594 (2008).
249. Leng, L. *et al.* MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 1467–1476 (2003).
250. Starlets, D. *et al.* Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* **107**, 4807–4816 (2006).

251. Sepanlou, S. G. *et al.* The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **5**, 245–266 (2020).
252. Dhar, D., Baglieri, J., Kisseleva, T. & Brenner, D. A. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med* **245**, 96–108 (2020).
253. Seki, E. & Schwabe, R. F. Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links and key pathways. *Hepatology* **61**, 1066–1079 (2015).
254. Berumen, J., Baglieri, J., Kisseleva, T. & Mekeel, K. Liver fibrosis: Pathophysiology and clinical implications. *WIREs Mechanisms of Disease* **13**, (2021).
255. Child, C. G. & Turcotte, J. G. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* **1**, 1–85 (1964).
256. Kamath, P. S. & Kim, W. R. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology* **45**, 797–805 (2007).
257. Wiesner, R. *et al.* Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* **124**, 91–96 (2003).
258. Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R. & Newsholme, P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients* **10**, 1564 (2018).
259. Irvine, K. M., Ratnasekera, I., Powell, E. E. & Hume, D. A. Causes and Consequences of Innate Immune Dysfunction in Cirrhosis. *Front Immunol* **10**, (2019).
260. Albillos, A. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* **37**, 208–217 (2003).
261. Borzio, M. *et al.* Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Digestive and Liver Disease* **33**, 41–48 (2001).
262. Butterworth, R. Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **22**, 309–320 (2007).
263. Garcia-Martinez, R. *et al.* Hepatic encephalopathy is associated with posttransplant cognitive function and brain volume. *Liver Transplantation* **17**, 38–46 (2011).
264. Amodio, P. *et al.* Prevalence and prognostic value of quantified electroencephalogram (EEG) alterations in cirrhotic patients. *J Hepatol* **35**, 37–45 (2001).
265. Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J. & Ahl, B. Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS* **19**, S93–S98 (2005).
266. Elsaid, M. I. & Rustgi, V. K. Epidemiology of Hepatic Encephalopathy. *Clin Liver Dis* **24**, 157–174 (2020).
267. Hassanein, T. I., Hilsabeck, R. C. & Perry, W. Introduction to the Hepatic Encephalopathy Scoring Algorithm (HESA). *Dig Dis Sci* **53**, 529–538 (2008).

## Bibliografía

268. Ortiz, M. *et al.* Development of a clinical hepatic encephalopathy staging scale. *Aliment Pharmacol Ther* **26**, 859–867 (2007).
269. Teasdale, G. & Jennett, B. Assessment of coma and impaired consciousness. *The Lancet* **304**, 81–84 (1974).
270. Lockwood, A. H. Blood Ammonia Levels and Hepatic Encephalopathy. *Metab Brain Dis* **19**, 345–349 (2004).
271. Grønbaek, H. *et al.* Liver cirrhosis, other liver diseases, and risk of hospitalisation for intracerebral haemorrhage: A Danish population-based case-control study. *BMC Gastroenterol* **8**, 16 (2008).
272. Prakash, R. K., Brown, T. A. & Mullen, K. D. Minimal Hepatic Encephalopathy and Driving: Is the Genie Out of the Bottle? *American Journal of Gastroenterology* **106**, 1415–1416 (2011).
273. Kircheis, G., Wettstein, M., Timmermann, L., Schnitzler, A. & Häussinger, D. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology* **35**, 357–366 (2002).
274. Romero-Gómez, M. *et al.* Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* **45**, 879–885 (2007).
275. Lauridsen, M. M., Thiele, M., Kimer, N. & Vilstrup, H. The continuous reaction times method for diagnosing, grading, and monitoring minimal/covert hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **28**, 231–234 (2013).
276. Amodio, P. *et al.* Clinical features and survival of cirrhotic patients with subclinical cognitive alterations detected by the number connection test and computerized psychometric tests. *Hepatology* **29**, 1662–1667 (1999).
277. Guerit, J.-M. *et al.* Neurophysiological investigations of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver International* **29**, 789–796 (2009).
278. Gropman, A. L., Summar, M. & Leonard, J. v. Neurological implications of urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis* **30**, 865–879 (2007).
279. Auron, A. & Brophy, P. D. Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Pediatric Nephrology* **27**, 207–222 (2012).
280. Crdova, H. & Crdoba, J. Encefalopatía hepática. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* **10**, 713–719 (2008).
281. Shawcross, D. L., Davies, N. A., Williams, R. & Jalan, R. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol* **40**, 247–254 (2004).
282. Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J. & Felipo, V. Inflammation and hepatic encephalopathy: Ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology* **46**, 514–519 (2007).

283. Cagnin, A., Taylor-Robinson, S. D., Forton, D. M. & Banati, R. B. In vivo imaging of cerebral 'peripheral benzodiazepine binding sites' in patients with hepatic encephalopathy. *Gut* **55**, 547–53 (2006).
284. Dennis, C. v. *et al.* Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **29**, 1027–1039 (2014).
285. Zemtsova, I. *et al.* Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology* **54**, 204–215 (2011).
286. Cauli, O. *et al.* Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: Ibuprofen restores its motor activity. *J Neurosci Res* **87**, 1369–1374 (2009).
287. Timmermann, L. *et al.* Mini-asterixis in hepatic encephalopathy induced by pathologic thalamo-motor-cortical coupling. *Neurology* **61**, 689–692 (2003).
288. Montoliu, C. *et al.* Reduced white matter microstructural integrity correlates with cognitive deficits in minimal hepatic encephalopathy. *Gut* **63**, 1028–1030 (2014).
289. Zhang, L. J. *et al.* Altered Brain Functional Connectivity in Patients with Cirrhosis and Minimal Hepatic Encephalopathy: A Functional MR Imaging Study. *Radiology* **265**, 528–536 (2012).
290. García-García, R. *et al.* Reduced resting state connectivity and gray matter volume correlate with cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *PLoS One* **12**, e0186463 (2017).
291. García-García, R. *et al.* Learning and Memory Impairments in Patients with Minimal Hepatic Encephalopathy are Associated with Structural and Functional Connectivity Alterations in Hippocampus. *Sci Rep* **8**, 9664 (2018).
292. Felipo, V. *et al.* Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology* **55**, 530–539 (2012).
293. Nagai, Y. *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* **3**, 667–672 (2002).
294. Miller, L. S. Toll-Like Receptors in Skin. *Adv Dermatol* **24**, 71–87 (2008).
295. Polak, A. *et al.* Toll-Like Receptors-2 and -4 in Graves' Disease—Key Players or Bystanders? *Int J Mol Sci* **20**, 4732 (2019).
296. Toskala, E. Immunology. *Int Forum Allergy Rhinol* **4**, S21–S27 (2014).
297. Durandy, A., Taubenheim, N., Peron, S. & Fischer, A. Pathophysiology of B Cell Intrinsic Immunoglobulin Class Switch Recombination Deficiencies. in 275–306 (2007). doi:10.1016/S0065-2776(06)94009-7.
298. Bonecchi, R. *et al.* Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 129–134 (1998).

299. Yang, R. *et al.* Human T-bet Governs Innate and Innate-like Adaptive IFN- $\gamma$  Immunity against Mycobacteria. *Cell* **183**, 1826-1847.e31 (2020).
300. Kunzmann, L. K. *et al.* Monocytes as Potential Mediators of Pathogen-Induced T<sub>H</sub>17 Helper 17 Differentiation in Patients With Primary Sclerosing Cholangitis (PSC). *Hepatology* **72**, 1310–1326 (2020).
301. Miossec, P., Korn, T. & Kuchroo, V. K. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *New England Journal of Medicine* **361**, 888–898 (2009).
302. Hirota, K., Martin, B. & Veldhoen, M. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol* **32**, 3–16 (2010).
303. Tesmer, L. A., Lundy, S. K., Sarkar, S. & Fox, D. A. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* **223**, 87–113 (2008).
304. Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* **8**, 345–350 (2007).
305. Huh, J. R. & Littman, D. R. Small molecule inhibitors of ROR $\gamma$ t: Targeting Th17 cells and other applications. *Eur J Immunol* **42**, 2232–2237 (2012).
306. McGeachy, M. J., Cua, D. J. & Gaffen, S. L. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity* **50**, 892–906 (2019).
307. Acosta-Rodriguez, E. v, Napolitani, G., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* **8**, 942–949 (2007).
308. Simpson, N. *et al.* Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **62**, 234–244 (2010).
309. Nograles, K. E. *et al.* IL-22-producing “T22” T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **123**, 1244-1252.e2 (2009).
310. Helmbj, H. & Grenicis, R. Interleukin 1 plays a major role in the development of Th2-mediated immunity. *Eur J Immunol* **34**, 3674–3681 (2004).
311. Schmitt, E. *et al.* IL-9 production of naive CD4<sup>+</sup> T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol* **153**, 3989–96 (1994).
312. Weaver, C. T. & Hatton, R. D. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol* **9**, 883–889 (2009).
313. Bolandi, Z. *et al.* Adipose derived mesenchymal stem cell exosomes loaded with miR-10a promote the differentiation of Th17 and Treg from naive CD4<sup>+</sup> T cell. *Life Sci* **259**, 118218 (2020).

314. Zheng, Y. *et al.* Exosomal microRNA-155-5p from PDLSCs regulated Th17/Treg balance by targeting sirtuin-1 in chronic periodontitis. *J Cell Physiol* **234**, 20662–20674 (2019).
315. Zhu, J. & Paul, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* **20**, 4–12 (2010).
316. Lee, Y. K. *et al.* Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage. *Immunity* **30**, 92–107 (2009).
317. Shi, G. *et al.* Phenotype Switching by Inflammation-Inducing Polarized Th17 Cells, but Not by Th1 Cells. *The Journal of Immunology* **181**, 7205–7213 (2008).
318. Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **30**, 646–655 (2009).
319. Pikor, N. B. *et al.* Integration of Th17- and Lymphotoxin-Derived Signals Initiates Meningeal-Resident Stromal Cell Remodeling to Propagate Neuroinflammation. *Immunity* **43**, 1160–1173 (2015).
320. Suto, A. *et al.* Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 1369–1379 (2008).
321. Attridge, K. *et al.* IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis. *Blood* **119**, 4656–4664 (2012).
322. Feldmann, M., Brennan, F. M., Foxwell, B. M. J. & Maini, R. M. The Role of TNF alpha and IL-1 in Rheumatoid Arthritis. *Curr Dir Autoimmun* **3**, 188–199 (2001).
323. Cha, H. J. *et al.* Tristetraprolin downregulates the expression of both VEGF and COX-2 in human colon cancer. *Hepatology* **58**, 790–5 (2011).
324. Moore, M. J. *et al.* ZFP36 RNA-binding proteins restrain T cell activation and anti-viral immunity. *Elife* **7**, (2018).
325. Taylor, G. A. *et al.* A Pathogenetic Role for TNF $\alpha$  in the Syndrome of Cachexia, Arthritis, and Autoimmunity Resulting from Tristetraprolin (TTP) Deficiency. *Immunity* **4**, 445–454 (1996).
326. Liu, F. *et al.* The Expression of Tristetraprolin and Its Relationship with Urinary Proteins in Patients with Diabetic Nephropathy. *PLoS One* **10**, e0141471 (2015).
327. Garg, A. v., Ahmed, M., Vallejo, A. N., Ma, A. & Gaffen, S. L. The Deubiquitinase A20 Mediates Feedback Inhibition of Interleukin-17 Receptor Signaling. *Sci Signal* **6**, (2013).
328. Heyninck, K. *et al.* The Zinc Finger Protein A20 Inhibits TNF-induced NF- $\kappa$ B-dependent Gene Expression by Interfering with an RIP- or TRAF2-mediated Transactivation Signal and Directly Binds to a Novel NF- $\kappa$ B-inhibiting Protein ABIN. *Journal of Cell Biology* **145**, 1471–1482 (1999).
329. Lee, E. G. *et al.* Failure to Regulate TNF-Induced NF- $\kappa$ B and Cell Death Responses in A20-Deficient Mice. *Science* (1979) **289**, 2350–2354 (2000).

## Bibliografia

330. Heyninck, K. & Beyaert, R. The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF- $\kappa$ B activation at the level of TRAF6. *FEBS Lett* **442**, 147–150 (1999).
331. Tavares, R. M. *et al.* The Ubiquitin Modifying Enzyme A20 Restricts B Cell Survival and Prevents Autoimmunity. *Immunity* **33**, 181–191 (2010).
332. Lee, A. *et al.* Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Induces Sustained Signaling and a Prolonged and Unremitting Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Arthritis Rheum* **65**, 928–938 (2013).
333. Urbano, P. C. M. *et al.* TNF- $\alpha$ -induced protein 3 (TNFAIP3) /A20 acts as a master switch in TNF- $\alpha$  blockade-driven IL-17A expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **142**, 517–529 (2018).
334. Navone, N. D. *et al.* Monocytes and CD4<sup>+</sup> T cells contribution to the under-expression of NR4A2 and TNFAIP3 genes in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **272**, 99–102 (2014).
335. Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* **18**, 14–17 (1997).
336. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. Biology of Lung Dendritic Cells at the Origin of Asthma. *Immunity* **31**, 412–424 (2009).
337. Nurieva, R. I., Liu, X. & Dong, C. Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol Rev* **229**, 88–100 (2009).
338. Broux, B., Markovic-Plese, S., Stinissen, P. & Hellings, N. Pathogenic features of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells in immune disorders. *Trends Mol Med* **18**, 446–453 (2012).
339. Thewissen, M. *et al.* CD4<sup>+</sup> CD28<sup>null</sup> T Cells in Autoimmune Disease: Pathogenic Features and Decreased Susceptibility to Immunoregulation. *The Journal of Immunology* **179**, 6514–6523 (2007).
340. Markovic-Plese, S., Cortese, I., Wandinger, K.-P., McFarland, H. F. & Martin, R. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 1185–1194 (2001).
341. Miyazaki, Y. *et al.* Expansion of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells producing high levels of interferon- $\gamma$  in peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* **14**, 1044–1055 (2008).
342. Pinto-Medel, M. J. *et al.* The CD4<sup>+</sup> T-cell subset lacking expression of the CD28 costimulatory molecule is expanded and shows a higher activation state in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **243**, 1–11 (2012).
343. Broux, B. *et al.* CX3CR1 drives cytotoxic CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells into the brain of multiple sclerosis patients. *J Autoimmun* **38**, 10–19 (2012).
344. Broux, B. *et al.* IL-15 Amplifies the Pathogenic Properties of CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T Cells in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology* **194**, 2099–2109 (2015).



345. Mangas-Losada, A. *et al.* Selective improvement by rifaximin of changes in the immunophenotype in patients who improve minimal hepatic encephalopathy. *J Transl Med* **17**, 293 (2019).
346. Hemler, M. E. Targeting of tetraspanin proteins — potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 747–758 (2008).
347. Rana, S. & Zöller, M. Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis. *Biochem Soc Trans* **39**, 559–562 (2011).
348. Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T. & Emr, S. D. Escrt-III. *Dev Cell* **3**, 271–282 (2002).
349. Mahmoodzadeh Hosseini, H., Ali Imani Fooladi, A., Reza Nourani, M. & Ghanezadeh, F. The Role of Exosomes in Infectious Diseases. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* **12**, 29–37 (2013).
350. McCullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 7687–7691 (2008).
351. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science (1979)* **319**, 1244–1247 (2008).
352. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 513–525 (2009).
353. Ostrowski, M. *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* **12**, 19–30; sup pp 1-13 (2010).
354. Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B. & Colombo, M. I. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1793**, 1901–1916 (2009).
355. Marshansky, V. & Futai, M. The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 415–426 (2008).
356. Corrado, C. *et al.* Exosomes as Intercellular Signaling Organelles Involved in Health and Disease: Basic Science and Clinical Applications. *Int J Mol Sci* **14**, 5338–5366 (2013).
357. van Niel, G. *et al.* Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* **121**, 337–349 (2001).
358. Qazi, K. R., Gehrman, U., Domange Jordö, E., Karlsson, M. C. I. & Gabrielsson, S. Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B cell-dependent mechanism. *Blood* **113**, 2673–2683 (2009).
359. Tian, T. *et al.* Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol* **228**, 1487–95 (2013).

## Bibliografia

360. Segura, E. *et al.* ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* **106**, 216–23 (2005).
361. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654–9 (2007).
362. Mittelbrunn, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* **2**, 282 (2011).
363. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654–659 (2007).
364. MacKenzie, A. *et al.* Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* **15**, 825–35 (2001).
365. Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. & Dubyak, G. R. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* **179**, 1913–25 (2007).
366. Cheng, Y. & Schorey, J. S. Extracellular vesicles deliver Mycobacterium RNA to promote host immunity and bacterial killing. *EMBO Rep* **20**, (2019).
367. Crenshaw, B. J., Gu, L., Sims, B. & Matthews, Q. L. Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. *Open Virol J* **12**, 134–148 (2018).
368. Gould, S. J., Booth, A. M. & Hildreth, J. E. K. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10592–7 (2003).
369. Lenassi, M. *et al.* HIV Nef is Secreted in Exosomes and Triggers Apoptosis in Bystander CD4+ T Cells. *Traffic* **11**, 110–122 (2010).
370. Narayanan, A. *et al.* Exosomes Derived from HIV-1-infected Cells Contain Trans-activation Response Element RNA. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 20014–20033 (2013).
371. Kitai, Y. *et al.* DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology* **198**, 1649–1659 (2017).
372. Montermini, L. *et al.* Inhibition of oncogenic epidermal growth factor receptor kinase triggers release of exosome-like extracellular vesicles and impacts their phosphoprotein and DNA content. *J Biol Chem* **290**, 24534–46 (2015).
373. Takahashi, A. *et al.* Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* **8**, 15287 (2017).
374. Chennakrishnaiah, S. *et al.* Leukocytes as a reservoir of circulating oncogenic DNA and regulatory targets of tumor-derived extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* **16**, 1800–1813 (2018).
375. Ding, G. *et al.* Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. *Oncotarget* **6**, 29877–88 (2015).

376. Ying, X. *et al.* Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget* **7**, 43076–43087 (2016).
377. Fabbri, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2110-6 (2012).
378. Chen, G. *et al.* Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* **560**, 382–386 (2018).
379. Ning, Y. *et al.* Tumor exosomes block dendritic cells maturation to decrease the T cell immune response. *Immunol Lett* **199**, 36–43 (2018).
380. Poggio, M. *et al.* Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* **177**, 414-427.e13 (2019).
381. Andreola, G. *et al.* Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* **195**, 1303–16 (2002).
382. Skokos, D. *et al.* Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J Immunol* **166**, 868–76 (2001).
383. Wolfers, J. *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* **7**, 297–303 (2001).
384. Zitvogel, L. *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat Med* **4**, 594–600 (1998).
385. Wang, S. *et al.* Synapsin I Is an Oligomannose-Carrying Glycoprotein, Acts As an Oligomannose-Binding Lectin, and Promotes Neurite Outgrowth and Neuronal Survival When Released via Glia-Derived Exosomes. *Journal of Neuroscience* **31**, 7275–7290 (2011).
386. Antonucci, F. *et al.* Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *EMBO J* **31**, 1231–1240 (2012).
387. Tytell, M. Release of heat shock proteins (Hsps) and the effects of extracellular Hsps on neural cells and tissues. *International Journal of Hyperthermia* **21**, 445–455 (2005).
388. Hu, G. *et al.* Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated Neuronal dysfunction. *Cell Death Dis* **3**, e381–e381 (2012).
389. Fevrier, B. *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 9683–9688 (2004).
390. Soria, F. N. *et al.* Exosomes, an Unmasked Culprit in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* **11**, 26 (2017).
391. Howitt, J. & Hill, A. F. Exosomes in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *J Biol Chem* **291**, 26589–26597 (2016).
392. Asai, H. *et al.* Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* **18**, 1584–93 (2015).

393. Baker, S., Polanco, J. C. & Götz, J. Extracellular Vesicles Containing P301L Mutant Tau Accelerate Pathological Tau Phosphorylation and Oligomer Formation but Do Not Seed Mature Neurofibrillary Tangles in ALZ17 Mice. *J Alzheimers Dis* **54**, 1207–1217 (2016).
394. Rajendran, L. *et al.* Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 11172–11177 (2006).
395. Emmanouilidou, E. *et al.* Cell-Produced  $\alpha$ -Synuclein Is Secreted in a Calcium-Dependent Manner by Exosomes and Impacts Neuronal Survival. *Journal of Neuroscience* **30**, 6838–6851 (2010).
396. Guo, B. B., Bellingham, S. A. & Hill, A. F. Stimulating the Release of Exosomes Increases the Intercellular Transfer of Prions. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 5128–5137 (2016).
397. Fitzner, D. *et al.* Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci* **124**, 447–58 (2011).
398. Anand, P. K. Exosomal membrane molecules are potent immune response modulators. *Commun Integr Biol* **3**, 405–408 (2010).
399. Cabrera-Pastor, A. *et al.* Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Acta Physiologica* **226**, e13270 (2019).
400. Weissenborn, K. Diagnosis of Minimal Hepatic Encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol* **5**, S54–S59 (2015).
401. Yang, D. *et al.* Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics* **10**, 3684–3707 (2020).
402. Felipo, V., Montoliu, C. & Llansola, M. Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Neuroimmunol Neuroinflamm* **2**, 138 (2015).
403. Jones, M. T., Manioci, S. W. & Russell, A. E. Size Exclusion Chromatography for Separating Extracellular Vesicles from Conditioned Cell Culture Media. *J Vis Exp* **183** (2022).
404. van den Elsen, P. J., Gobin, S. J. P., van Eggermond, M. C. J. A. & Peijnenburg, A. Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. *Immunogenetics* **48**, 208–221 (1998).
405. Bajaj, J. S. *et al.* Area Deprivation Index and Gut-Brain Axis in Cirrhosis. *Clin Transl Gastroenterol* **13**, e00495 (2022).
406. Santana Vargas, Á. D., Higuera-De la Tijera, F. & Pérez-Hernandez, J. L. Auditory and visual P300 event-related potentials to detect minimal hepatic encephalopathy. *Rev Esp Enferm Dig* **114**, 83-88 (2021).

407. Luo, M. *et al.* EncephalApp stroop test versus electronic number connection test-A for screening minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis: a comparative study. *Scand J Gastroenterol* **57**, 1066–1069 (2022).
408. Schuhmann, B. *et al.* A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol* **163**, 15–23 (2005).
409. Colo Brunialti, M. K. *et al.* Increased Percentages of T Helper Cells Producing IL-17 and Monocytes Expressing Markers of Alternative Activation in Patients with Sepsis. *PLoS One* **7**, e37393 (2012).
410. Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *New England Journal of Medicine* **348**, 138–150 (2003).
411. Salomao, R. *et al.* Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock\*. *Crit Care Med* **37**, 132–139 (2009).
412. Bingold, T. M. *et al.* interleukin-22 detected in patients with abdominal sepsis. *Shock* **34**, 337–340 (2010).
413. Hubert, A. *et al.* Elevated Abundance, Size, and MicroRNA Content of Plasma Extracellular Vesicles in Viremic HIV-1+ Patients. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **70**, 219–227 (2015).



## **X. ANEXOS**







Hospital Clínic Universitari



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

Don Diego V. Cano Blanquer, Secretario del Comité Ético de Investigación del Hospital Clínic Universitari de Valencia

**CERTIFICA**

Que en este Comité, en su reunión de fecha 27 de febrero de 2018, 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 y cerebrales en pacientes con encefalopatía hepática mínima. Contribución de la Inflamación. Implicaciones diagnósticas y terapéuticas***

Mismo que será llevado a cabo en el Laboratorio de Deterioro Neurológico del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA en colaboración con el Servicio de Medicina Digestiva y cuya investigadora principal es la Dra. Carmina Montoliu Félix, 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** (Paris 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la convocatoria de Ayudas a Proyectos de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III 2018.

Valencia, 27 de febrero de 2018.

Fdo. : Don Diego V. Cano Blanquer  
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica



Hospital Clínic Universitari

CARMINA MONTOLIU FELIX  
Fundación HUCUV



Valencia, 02 de marzo de 2018

Estimada Dra. Montoliu,

El motivo de la presente es informarle que en la pasada reunión del Comité de Ética del Hospital Clínic Universitario de Valencia de fecha 27 de febrero de 2018, ha sido evaluado el proyecto titulado "Caracterización de las alteraciones neurológicas y cerebrales en pacientes con encefalopatía hepática mínima. Contribución de la Inflamación. Implicaciones diagnósticas y terapéuticas" del cual usted es la investigadora principal.

En dicha evaluación, se acordó informar favorablemente.

Así mismo, se le informa que la legislación vigente en investigaciones donde se va a proceder a la toma de muestras de pacientes, es la Ley 14/2007 de 3 de julio, de Investigación Biomédica y estas investigaciones deberán cumplir dicha normativa.

En caso de requerir información adicional, no dude en ponerse en contacto con la secretaria del Comité.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Dra. Marina Soro Domingo  
Presidenta del Comité Ético de Investigación