

# ALESSANDRA FIORILLO

*Programa de Doctorado en Neurociencias*

**Caracterización de los cambios en el  
inmunofenotipo asociados a la aparición del  
deterioro cognitivo leve en pacientes  
con enfermedad de hígado graso no alcohólico.**



*directoras:*

**Carmina Montoliu Félix**

**Teresa Consuelo San Miguel Díez**

*Valencia, Julio 2023*

# VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Fundación Investigación Clínico de Valencia-INCLIVA

## *Programa de doctorado en Neurociencias*



### **Caracterización de los cambios en el inmunofenotipo asociados a la aparición del deterioro cognitivo leve en pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

**Alessandra Fiorillo**

Directores:

**Carmina Montoliu Félix**

**Teresa Consuelo San Miguel Díez**

Director académico:

**Carmina Montoliu Félix**

Valencia, Julio 2023





La **Dra. Carmina Montoliu Félix**, investigadora de la FIHCV-INCLIVA y Profesora Titular del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia,

La **Dra. Teresa Consuelo San Miguel Díez**, Profesora Titular del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia,

Certifican:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D<sup>a</sup> **Alessandra Fiorillo**, titulada “Caracterización de los cambios en el inmunofenotipo asociados a la aparición del deterioro cognitivo leve en pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

**MARIA DEL CARMEN | MONTOLIU | FELIX**  
Firmado digitalmente por MARIA DEL CARMEN | MONTOLIU | FELIX  
Fecha: 2023.07.25 12:23:26 +02'00'

Carmina Montoliu Felix

**TERESA CONSUELO | SAN MIGUEL | DIEZ**  
Firmado digitalmente por TERESA CONSUELO | SAN MIGUEL | DIEZ  
Fecha: 2023.07.25 12:47:20 +02'00'

Teresa Consuelo San Miguel Díez

En Valencia, Julio 2023



## Agradecimientos

Antes de proceder, me gustaría dedicar unas palabras a todos aquellos que me han acompañado en este camino de crecimiento personal y profesional.

En primer lugar, quiero expresar un agradecimiento especial a mis directoras de tesis las Doctoras Carmina Montoliu y Teresa San Miguel, por su inmensa paciencia, su apoyo y sus consejos indispensables durante todo el proceso de redacción de este trabajo.

Agradezco de corazón la colaboración de los profesionales del Servicio de Hepatología de los Hospitales Clínico de Valencia y Arnau de Villanova, así como de todos los pacientes y sujetos de control que generosamente participaron en este estudio. Su contribución ha sido esencial para el desarrollo exitoso de este trabajo.

Un sincero reconocimiento a la Doctora Amparo Urios, cuyas valiosas indicaciones y sugerencias han enriquecido significativamente el contenido y la calidad de este trabajo.

Gracias al profesor Rajiv Jalan y a todo su equipo del Royal Free Hospital, en Londres, por acogerme y ayudarme durante mi estancia de tesis.

Me gustaría dar las gracias a todos los compañeros que han pasado por el lab 3. Un agradecimiento especial a Franc por su ingenua sinceridad. Un gracias enorme a la reina del Western Blot, compañera de padel, cervezas y “juernes” locos, a mi amiga Alejandra. Gracias a la pequeña y gran Clara, eres una persona única y especial.

Gracias Juanjo. En estos años, he tenido la suerte de compartir mi aventura con una persona increíble, mi colega, amigo, confidente, mi hermano español. Hay muchas cosas por las cuales debería agradecerle, hemos compartido tanto: misma bancada, tardes enteras encerrados en el laboratorio frente a un ordenador, muchos cafés (en el mortuorio, nos gusta así). Hemos compartido frustraciones, llantos, alegrías y sonrisas. Has sido mi puerto seguro durante los momentos difíciles y mi fuente de alegría durante los momentos felices. Sin ti, nunca lo habría logrado.

Vorrei ringraziare i miei genitori, il mio faro e sostegno costante. Grazie ai miei fratelli, Roberta, Luigi e Benny, per essere sempre al mio fianco. Un grazie ai miei zii, cugini, e in particolare alle mie nonne, che mi hanno sempre sostenuto e incoraggiato, non importa quanto distanti potessero essere. Grazie al mio folle fratello maggiore acquisito, Roberto. Grazie alla mia amica Morena, per i nostri interessanti fine settimana tra Madrid e Valencia e per tutto ciò che abbiamo condiviso e divideremo ancora, insieme.

Gracias y grazie a mis “nuevos” amigos en Valencia, e ai “vecchi” amici. Ancora grazie alla mia grande famiglia di Porto Pollo, fonte di energia indispensabile. Grazie anche a te, Rossella, una preziosa e pazza rivelazione. E soprattutto un immenso grazie ai miei amici, i migliori, Daniele e Francesca.

Finalmente, un agradecimiento a mí misma por la perseverancia y determinación demostradas durante este importante e intenso viaje.



*A mio padre,  
a mia madre,  
ai miei fratelli,  
a noi.*



### SUMMARY

#### 1. Introduction

##### *1.1 The Liver and Liver Diseases*

The liver is the largest gland in the human body and plays a vital role in the metabolism of macronutrients. It serves as the critical center for various physiological processes, including glycogen storage, synthesis, and degradation of plasma proteins (such as albumin) and amino acids, bile secretion, lipid and cholesterol homeostasis, and elimination of toxic substances from the blood, including many drugs (Trefts et al., 2017).

The liver is composed of different types of cells with unique functions, occupying approximately 78-84% of the liver volume. The remaining 16-22% of the liver volume consists of the space and extracellular matrix (Rojkind et al., 1982). The different cell types are classified into two main categories: parenchymal cells and non-parenchymal cells. Parenchymal cells, or hepatocytes, are the largest and most abundant cells, accounting for 60% of all liver cells. Non-parenchymal cells, which are smaller in size and fewer in number, include biliary epithelial cells or cholangiocytes, sinusoidal or endothelial cells, hepatic stellate cells (HSCs), Kupffer cells or macrophages, and hepatic natural killer (NK) cells (LeCluyse et al., 2012).

The multiple functions performed by the liver, its characteristic structure, and its strategic position in the human body are important factors that contribute to various liver diseases with diverse etiologies, making liver diseases the fourth to fifth leading cause of death worldwide. Moreover, the liver is a vulnerable organ, and viral infections, alcohol abuse, drugs, and excessive dietary fat can cause damage and dysfunction.

Parasites and viruses can infect the liver, causing inflammation that impairs liver function. The most common types of liver infection are hepatitis viruses, including hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, and hepatitis E.

Liver cirrhosis is the end consequence of chronic inflammation in the liver that destroys hepatocytes and leads to scarring, which irreversibly reduces organ function. If advanced,

## Summary

cirrhosis can be potentially fatal. Alcoholism, cystic fibrosis, and viral hepatitis are the main causes of cirrhosis.

The accumulation of excess fat in the liver leads to fatty liver disease. This condition can be of alcoholic or non-alcoholic etiology, depending on whether it derives from alcohol consumption or not. Other direct threats to the liver include cancer and autoimmune diseases.

### *1.2 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by excessive lipid deposition in the liver (macrovesicular steatosis) in more than 5% of hepatocytes, in the absence of significant alcohol consumption or alternative causes. NAFLD encompasses a spectrum of diseases ranging from simple steatosis, also known as non-alcoholic fatty liver (NAFL), to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and the development of fibrosis, which can progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (Serfaty et al, 2008).

It is crucial to differentiate patients with simple non-progressive steatosis from those with NASH, who have a higher risk of developing cardiovascular disease or progressing to advanced liver diseases such as cirrhosis and HCC. Early detection and appropriate management strategies are essential to prevent the progression of NAFLD to severe liver-related complications and the occurrence of serious complications such as ascites (accumulation of fluid in the abdomen), esophageal varices (enlarged blood vessels in the esophagus), hepatic encephalopathy (brain dysfunction due to liver failure), HCC, and liver failure.

NAFLD has become one of the most common chronic liver diseases worldwide. The prevalence of NAFLD varies across regions, with rates around 25% globally. The highest rates are observed in the Middle East (32%), followed by Europe (23%), while Africa (13%) has a comparatively lower prevalence (Younossi et al.,2016).

NAFLD is closely associated with several metabolic disorders and risk factors, including type 2 diabetes, central obesity, dyslipidemia, and metabolic syndrome. These conditions frequently coexist with NAFLD, with prevalence rates ranging from 23% for diabetes to

69% for metabolic syndrome among individuals with NAFLD. Age, increased BMI (body mass index), and diabetes are identified as risk factors for disease progression in NAFLD patients. (Maurice and Manousou, 2018).

Several studies have shown that NAFLD itself poses an increased risk of cardiovascular disease, making it a leading cause of mortality in these patients. Approximately 40% of deaths in individuals with NAFLD are attributed to cardiovascular complications. (Sinn et al., 2017).

Hepatic steatosis, characterized by the accumulation of fat in liver cells (hepatocytes), is a common feature of both NAFL and NASH. Steatosis occurs when the uptake or synthesis of fat by hepatocytes exceeds its export or degradation (Grefhorst et al., 2020). Triglycerides are the most abundant lipid type that accumulates in hepatocytes.

NASH, a more severe form of NAFLD, is characterized by additional histological features such as macrovesicular steatosis, ballooning of hepatocytes ballooning, and scattered inflammation, primarily in the liver lobules. Fibrosis, the deposition of excess extracellular matrix, may also be present in NASH (Brown et al., 2016). While simple steatosis (NAFL) has generally been considered relatively a benign condition, NASH is a progressive disease that can lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (Kleiner and Makhlof, 2016). Liver fibrogenesis is the process of tissue repair after liver damage, involving different cell types and profibrogenic cytokines (Torre et al., 2021). In a healthy liver tissue, the extracellular matrix consists of non-fibrillar collagen types IV and VI, along with small amounts of collagen types I and III.

However, prolonged inflammation and repair processes disrupt the balance between matrix synthesis and degradation, resulting in liver fibrosis. This process leads to an excessive deposition of extracellular matrix, predominantly composed of type III collagen, small amounts of type I collagen, fibronectin, and various glycosaminoglycans, and to an inability of hepatocytes to regenerate (Burt et al. 2018b). In advanced fibrosis stages, collagen bands become more evident, and bridging fibrosis is detected, eventually progressing to cirrhosis, with the formation of fibrous septa between portal spaces (Odena and Ramon, 2012).

The severity and stages of fibrosis are classified into four categories: F0 represents no fibrosis or scarring, F1 indicates minimal fibrosis, F2 signifies significant fibrosis, F3

## Summary

represents severe fibrosis, and F4 denotes advanced cirrhosis or scarring. These classifications help assess the extent and progression of liver fibrosis in NAFLD patients.

### *1.3 Mild Cognitive Impairment in NAFLD patients*

Mild cognitive impairment (MCI) has been identified as a possible complication associated with NAFLD.

Mild cognitive impairment (MCI) is defined as a mild decline in cognition function that is not attributable to normal aging but is a consequence of an underlying medical condition. This disorder can affect several cognitive domains, such as memory, language, visuospatial function, attention, or concentration (Colognesi et al., 2020). However, these impairments are not severe enough to meet the criteria for a diagnosis of dementia. (Sanford A. M., 2017).

Several studies have investigated cognitive impairment in NAFLD patients, although the methodology for assessing and detecting cognitive impairment in this population is not yet well defined. A recent study by Seo et al. detected impairments in attention and memory in subjects with NAFLD (Seo et al., 2016). Weinstein et al. showed that NAFLD patients with high risk of fibrosis had difficulties with abstract reasoning and processing speed (Weinstein et al, 2019). Studies by Celikbilek and Tuttolomondo found deficits in executive and visuospatial functions using the MoCA and MMSE test batteries, respectively (Celikbilek et al., 2018; Tuttolomondo et al., 2018).

Inflammation is a key feature in the development of NAFLD, particularly in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Lipid accumulation in the liver and hepatocyte injury stimulate the secretion of chemokines to induce macrophage recruitment to the liver, and thus the production of several proinflammatory cytokines (Fricker et al.,2019).

Inflammatory processes in the liver can spread to other organs, including the brain, through various mechanisms. On this basis, it has been proposed that systemic inflammation has been proposed as a contributing factor to cognitive impairment in NAFLD and metabolic syndrome, but it is not yet clear how inflammation spreads to the brain (Miller and Spencer,2014; Viscogliosi et al., 2013).

In a study by our group, using the PHES test battery, they showed that patients with simple steatosis had no cognitive impairment, whereas patients with NASH and high levels of ammonium and inflammatory parameters in the blood showed worsened performance in all tests assessed. This suggests that the greater the severity of the disease, and consequently the greater the inflammation and hyperammonaemia, the greater the risk of cognitive impairment in NAFLD.

Veniaminova et al. demonstrated that, in non-obese mice, abnormal intake of high-calorie foods is associated with changes in gene expression in the prefrontal cortex, which is involved in the control of inhibitory behavior, and dysfunction in motor coordination (Veniaminova et al., 2020).

In animal models, chronic consumption of FPC diet (fructose, palmitate, and cholesterol) has been shown to negatively affect liver health and cognition. The altered gut microbiota, and its metabolites, including bile acids, affect signaling of the pro-inflammatory cytokine IL-17A, causing alterations in cognitive functions (Jena et. al, 2020).

Furthermore, Kim et al. demonstrated that NAFLD accelerates Alzheimer's disease symptoms in the central nervous system (CNS) by inducing neuronal apoptosis and decreasing the expression of lipoprotein receptor 1 (LRP1), which is responsible for the clearance of  $\beta$ -amyloid plaque in Alzheimer's disease (Kim et al., 2016).

In a study by our group, we demonstrated the presence of neuroinflammation in post-mortem cerebellum of NAFLD patients, with activation of microglia and astrocytes in cerebellar meninges, associated with a loss of granular and Purkinje neurons and infiltration of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, Th17, Th1, and CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (Balzano et al., 2018).

Hyperammonemia, which is observed in cirrhotic patients and also occurs in NAFLD, has been implicated in the development of cognitive impairment (Lykke et al., 2019; Thomsen et al., 2014; De Chiara et al., 2018; Eriksen et al., 2019).

Studies have shown that hyperammonaemia, in combination with inflammation, contributes to the development of HE in cirrhotic patients. Furthermore, in patients with NASH, a study from our group (Felipo et al. 2012) demonstrated the crucial synergistic role of hyperammonaemia and inflammation in the development of cognitive impairment in these

## Summary

patients. Another study, in rats with diet-induced NASH, confirmed the cognitive dysfunction associated with systemic hyperammonaemia and altered neurotransmitter concentrations in different brain regions (Higarza et al., 2019).

The gut microbiota plays a key role in the bidirectional communication between the gut and the brain, known as the microbiota-gut-brain axis. Dysfunction of the microbiota-gut-brain axis is associated with HE in cirrhotic patients, and this association is evidenced by beneficial effects on cognitive impairment following fecal microbiota transplantation, treatment with laxatives, lactulose, or rifaximin (Bajaj, 2014; Bajaj et al., 2015; Vilstrup et al., 2014).

Dysbiosis and increased gut permeability in NAFLD lead to the translocation of bacteria and endotoxins to the liver, triggering hepatic inflammation, lipogenesis, oxidative stress, insulin resistance, and fibrogenesis (Ilan and Leky, 2012; Raman et al., 2013; Zhu et al., 2013). Some studies have suggested a correlation between altered gut microbiota and cognitive dysfunction in NAFLD patients, but this relationship has not yet been demonstrated. In NASH rats, in addition to hyperammonemia, neurobehavioral dysfunction was associated with gut dysbiosis and decreased short-chain microbial fatty acids (Higarza et al., 2019). Treatment with probiotics has shown beneficial effects on cognitive function and liver health in animal models of NASH, indicating the potential role of the gut microbiota in NAFLD-related cognitive impairment. (Mohammed et al., 2020).

Metabolic dysfunctions associated with NAFLD, such as diabetes and obesity, have been recognized as risk factors for neurodegeneration, mild cognitive impairment, and dementia (Ng et al., 2016; Atti et al., 2019; Cheng et al., 2012; Pedditzi et al., 2016).

Solfrizzi et al. suggested that liver fibrosis could be a potential risk factor for the incidence of dementia in NAFLD patients with physical frailty (Solfrizzi et al., 2020).

According to estimates by Weinstein et al. using MRI brain studies, NAFLD was independently associated with a reduction in total brain volume, corresponding to 4.2 years of brain ageing compared to age-matched controls (Weinstein et al., 2018).

### ***1.4 Immune system and peripheral inflammation***

The immune system comprises organs, cells, humoral factors, and highly specialized cytokines. Its main role is to safeguard the body against external agents or internal injuries that may lead to infections. In countering the pathogen or toxic substance, the immune system employs a series of protective and controlled mechanisms to prevent excessive damage to their tissues while sparing beneficial commensal microbes. These mechanisms are primarily based on recognizing and differentiating the structural characteristics of the pathogen or toxin from the host cells. The ability of the immune system to avoid triggering harmful responses against the body's own tissues is known as self-tolerance. Immune tolerance refers to the lack of response to an antigen, whether self or external, due to prior exposure (Chaplin, 2010).

To defend the body from external pathogens, the immune system can activate two different types of response: the innate response and the adaptive response. Both responses involve discrimination between self and non-self and operate through different mechanisms of action, response duration, and specificity against external pathogens.

The innate immune system represents a rapid, non-specific response may cause tissue damage; while the adaptive immune system shows a high memory and specificity, but it is not immediate and may take several days or weeks to develop (Parkin and Cohen, 2001; Tomar and De, 2014). However, innate, and adaptive responses are activated together, modulating and stimulating each other. Therefore, the synergy between them is essential for an intact and fully effective immune response (Chaplin, 2010).

The *innate immune response* consists of barriers that provide immediate defense against pathogens, preventing their entry into the body. These barriers form the first line of defense in the immune response. Although not specific, the innate system can recognize foreign molecules by identifying small sequences of molecules known as *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) (Parkin & Cohen, 2001). These patterns are recognized by

## Summary

Pattern-recognition receptors (*PRRs*), and the main *PRRs* are toll-like receptors (*TLRs*) and NOD-like receptors (*NLRs*) (*Akira et al., 2006*).

However, the most important receptors are the TLR family, which can recognize a wide variety of microbial agents and induce an immune response. TLR receptors are found in different cells of the immune system as well as in other cell types such as fibroblasts, epithelial cells, and keratinocytes. In mammals, 11 different types of TLR receptors have been described, mostly expressed on the cell surface, but some are also distributed in endosomal compartments (*Herrero, 2010*).

The innate immune system comprises four types of defensive barriers that prevent pathogen entry and proliferation: anatomical (skin and mucous membranes), physiological (temperature, low pH), inflammatory (serum proteins), and phagocytic (phagocytic cells) (*Tomar & De, 2014*).

The cells responsible for the innate immune response include monocytes/macrophages, which have phagocytic capacity and stimulate other immune cells by releasing enzymes, proteins, and other regulatory factors. Granulocytes are divided into basophils, neutrophils, and eosinophils. Neutrophils, the most abundant leukocytes in the bloodstream, can perform phagocytosis to protect the body against foreign agents. Basophils and eosinophils are important in defense against parasites and play a role in allergic reactions such as asthma. Natural killer (NK) cells have lymphocyte-like morphology but lack a specific antigen receptor. These cells have receptors for major histocompatibility complex class I (MHC-I) on their surface. NK cells are activated and recognize compromised host cells with low levels of MHC-I, leading to their lysis through the secretion of perforins. Mast cells and platelets are critical in the induction and maintenance of inflammation.

Monocytes play an essential role in the effective control of innate defense and the elimination of viral, bacterial, fungal, and protozoan infections. However, monocytes may also contribute to the pathogenesis of inflammatory and degenerative diseases (*Shi and Pamer, 2011*).

Among the populations of monocytes, there are classical monocytes ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), intermediate monocytes ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ), and non-classical monocytes ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ).

classical monocytes constitute the majority (90-95%) of circulating monocytes, while intermediate and non-classical monocytes make up about 5% of the total monocyte population. Classical and intermediate monocytes are characterized by increased expression of chemokine receptors CCR2 and CCR7 and low levels of CX3CR1, while non-classical monocytes have large amounts of CX3CR1 and lower expression of CCR2 (Shi and Pamer, 2011). Classical monocytes are generally associated with phagocytic and antimicrobial activity, intermediate monocytes predominantly exhibit pro-inflammatory activity by producing pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-23, and non-classical monocytes have anti-inflammatory activity and mainly produce IL-10.

During the inflammation process, monocytes migrate from the blood to lymphoid tissues in response to tissue damage caused by inflammation. Once there, they produce pro-inflammatory cytokines and phagocytize apoptotic cells and toxic molecules. Moreover, they can differentiate into macrophages, which, depending on the environment, can become either M1 or pro-inflammatory macrophages or M2 or anti-inflammatory macrophages (Boscá et al., 2015).

Macrophages are widely distributed in the human body and play a crucial role in maintaining homeostasis and defending against pathogen invasion. Their main functions include phagocytosis and subsequent bacterial lysis, as well as antigen degradation into peptides. Microbial lipopolysaccharide (LPS) can favor polarization of macrophages to the M1 phenotype, while IL-4, IL-13, and IL-10 can induce polarization of macrophages to M2. M1 macrophages produce pro-inflammatory factors such as IL-6, IL-12, and tumor necrosis factor (TNF), whereas M2 macrophages express the enzyme arginase-1 (Arg-1) and the anti-inflammatory interleukin 10 (IL-10).

In infected tissues, macrophages are first polarized to a pro-inflammatory M1 phenotype to help the host against pathogens. Subsequently, they polarize to the anti-inflammatory M2 phenotype and play an important role in tissue repair, angiogenesis, and metabolism (Yunna et al., 2020). Another important role of macrophages is acting as antigen-presenting cells, allowing lymphocytes to detect them and trigger a specific immune response.

## Summary

The *adaptive immune response* is a more complex immune response that differs from the innate response in terms of specificity and memory.

It involves B and T lymphocytes, which differentiate and mature in the bone marrow before migrating to the lymphoid organs where they recognize specific antigens. Upon recognition, *naïve* cells proliferate and activate, becoming effector cells responsible for immune responses, or they can remain as memory cells. (Chaplin, 2010). The adaptive immune response can be classified as humoral or cellular.

The humoral immune response is mediated by B lymphocytes and antibodies, while the cellular response is mediated by T lymphocytes. These two types of response do not act independently, as B lymphocytes can proceed by presenting the antigen to T lymphocytes, while T lymphocytes can help B lymphocytes generate antibodies.

The humoral response begins when *naïve* B cells recognize their specific antigen in secondary lymphoid tissues and organs. B lymphocytes have an antigen receptor called the B-cell receptor (BCR), a non-secretable surface immunoglobulin molecule (IgM or IgD), which binds to specific antigen domains. Upon recognition, B cells mature, activate, and differentiate into plasma cells or antibody-secreting cells (ASCs) that synthesize and secrete immunoglobulins (antibodies) specific to the antigen.

The first time that receptor meets the antigen, the humoral response is called primary. During the primary humoral response, IgM antibodies are initially secreted in monomeric form and later, isotopic switching occurs, resulting in the secretion of different classes of immunoglobulins such as IgG. Some activated B cells survive as long-lived memory cells, providing a secondary immune response upon subsequent exposures to the same antigen.

Antibodies can internalize antigens, process them, and finally present them to T cells through the major histocompatibility complex (MHC), leading to a T-cell dependent response. T-cell recognition of the antigen allows for isotype switching of IgM to immunoglobulins IgA, IgE, or IgG, depending on the cytokines secreted by the T helper cell. (Chaplin, 2010). The co-stimulatory molecule CD40 on B cells and the CD40 ligand (CD40L) on T cells play a crucial role in isotype switching.

## Summary

The T-cell independent responses are induced by antigens with repetitive epitopes (mainly polysaccharides) that bind to multiple B cell receptors and activate them directly to secrete IgM antibodies. However, as there is no germinal center formation, this type of response lacks affinity maturation and memory. Therefore, T-cell independent responses are limited, low-specificity, and short-lived IgM (Parkin & Cohen, 2001).

The cellular response is mediated by T lymphocytes. The important role of T lymphocytes is to recognize infected cells, after identification of specific antigens, and destroy them. T-cell development and maturation begin with hematopoietic stem cells in the bone marrow, followed by differentiation into common lymphoid progenitors. Only a small subset of cells migrates to the thymus and differentiates into early thymic progenitors (Yang et al., 2010).

T lymphocytes recognize antigens presented by antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells, macrophages, and B cells.

APCs phagocytize pathogens, break them down into fragments, and present these fragments on molecules called major histocompatibility complexes class I (MHCI) or class II (MHCII), for recognition by T-cell receptors (TCRs). To ensure adequate and complete activation of T cells, the binding of TCR to the antigen-MHC complex is not sufficient. Co-stimulatory molecules, such as CD80, CD86, and CD40 on APCs, interact with co-receptors on CD28, CTLA-4 and CD40L T lymphocytes respectively, providing additional signals for T-cell activation (Parkin & Cohen, 2001).

Upon activation, *naïve* T cells differentiate into effector cell subtypes or memory lymphocytes. Memory lymphocytes provide immediate protection and are divided, by expression of the membrane markers CD62L and CCR7, into central memory lymphocytes and effector memory lymphocytes. Central memory T lymphocytes are CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> and effector memory T lymphocytes are CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> and have a complementary function against a second infection (Sallusto et al., 2004).

The main subtypes of T lymphocytes are defined by the expression of CD4 (T helper (Th) or effector cells) and CD8 (cytotoxic or cytolytic T cells (Tc)) molecules on their cell membrane. Th (CD4<sup>+</sup>) cells recognize the peptide bound to class II MHC molecules, while Tc (CD8<sup>+</sup>) cells recognize peptides bound to class I MHC molecules (Chaplin, 2010). CD4<sup>+</sup>

## Summary

lymphocytes primarily act through the secretion of cytokines and cell surface molecules to activate other cells in response to pathogenic microorganisms, whereas CD8<sup>+</sup> cells are directly cytotoxic and produce molecules that directly kill infected host cells. CD8<sup>+</sup> cells are activated during viral or bacterial infections, but they also kill tumor cells expressing antigens recognized as foreign (Chaplin, 2010).

CD4<sup>+</sup> T helper lymphocytes differentiate into various cellular subpopulations influenced by the type of antigen, antigen-presenting cells, cytokines, and co-stimulatory molecules. The different subtypes of CD4<sup>+</sup> cells include Th1, Th2, Th17, Tregs, Th9, Th22, and follicular Th cells, each with specific cytokine profiles and functions.

Th1 cells focus on cellular immunity against bacterial infections and intracellular pathogens and are also implicated in autoimmune diseases. Its differentiation is induced by the interleukins IL-12, IL-18, and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), secreted by dendritic cells and macrophages after recognition of intracellular pathogens (Zhu et al., 2010; Paul and Zhu, 2010). In general, the Th1-mediated response depends on the transcription factor TBX21 (*T-Box Transcription Factor 21*) and the molecule STAT4. These cells are producers of IFN- $\gamma$  and IL-12 (Kaiko, 2008).

Th2 cells play a role in protection against extracellular pathogens and allergens by stimulating antibody production and promoting eosinophilia and mast cell hyperplasia. It differs by the effect of IL-4, which induces intracellular activation of STAT-6 and its transcription factor GATA-3 (where G = Guanine, A = Adenine and T = Thymine). Th2 cells secrete cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, which favor the production of antibodies, tissue eosinophilia and mast cell hyperplasia (Paul and Zhu, 2010).

Th17 cells are primarily found in mucosal tissues and are associated with protecting the intestinal barrier and inflammatory response. They have also been implicated in inflammatory and brain diseases. They are activated by the combined action of IL-6, IL-21 and IL-23 that induce STAT3 and the nuclear transcription factor RORC (*RAR-related orphan receptor C*) IL-23 regulates survival and activation of Th17 after differentiation and expression of IL-17 (Miossec, 2009). The role of Th17 cells in protecting the intestinal barrier, where they regulate and maintain intestinal homeostasis after microbial attack,

whether of fungal or bacterial origin, has been widely documented (Stockinger and Omenetti, 2017). The inflammatory environment generated by Th17 cells is associated with diseases that have an important inflammatory component such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, bronchial asthma, and transplant rejection. Recently there are studies that indicate that Th17 acts in the brain and would be involved in brain diseases associated with cognitive impairment (Cipollini et al., 2019). They mainly produce IL-17A and IL-17F, but also IL-21, IL-22, IL-23, IL-6, IFN- $\gamma$ , and granulocyte-colony stimulating factor (GM-CSF) (Cipollini et al., 2019).

Th22 cells are involved in inflammatory skin diseases and produce cytokines such as IL-22 and TNF- $\alpha$ , which induce STAT3 and the transcription factor AHR (*Aryl hydrocarbon receptor*) (Eyerich et al, 2009).

Follicular T cells (Tfh) assist B cells in antibody production and the development of memory B cells. The transcription factor BCL6 (*B-cell lymphoma 6*) acts, in conjunction with other antagonistic transcription factors, during the differentiation of Tfh cells, following the activation of STAT3 and the action of IL-6, IL-12, and IL-21. In addition, they secrete cytokines such as IL-21, IL-4, and IL-10 that induce B-cell differentiation and antibody production (King, 2009).

Regulatory T cells (Tregs) are important in preventing autoimmune diseases and have regulatory functions through cytokine production, such as IL-10, TGF- $\beta$ , IL-5, and adenosine, which inhibit the secretion of specific cytokines of the Th1, Th2, and Th17 phenotypes, and induction of effector cell apoptosis. Tregs cells express CD25 on the surface induced by STAT5, and the transcription factor FOXP3 (*Forkhead box P3*), essential for their development, induced by SMAD2/3 and by the action of the factor TGF- $\beta$  (Burchill et al., 2007).

TGF- $\beta$  and IL-4 promote differentiation of Th9 cells that produce IL-9 and IL-10 and do not express cytokines or transcription factors of the Th1, Th2 or Th17 subsets. IL-9 (Ma CS, 2010). During allergic processes and helminth infections, IL-9 stimulates the release of mast cell products and indirectly induces mucus production, tissue eosinophilia and muscle contraction.

## Summary

These different subpopulations of T helper cells play key roles in the immune response, adapting to the specific demands of the body and contributing to protection against pathogens and regulation of the immune response.

At the beginning and in the effector phase of innate and adaptive immune responses, cells of the immune system interact with each other and with other cells by the action of proteins called cytokines. Cytokines play a crucial role in regulating innate and adaptive immune responses. Their interaction with receptors on immune and non-immune cells triggers specific cellular responses and can influence the development of various inflammatory and autoimmune diseases.

There are different families of cytokines, such as interleukins, interferons, and chemokines, which differ in their proinflammatory or anti-inflammatory function. Some important proinflammatory cytokines include tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17), interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-18 (IL-18).

For example, TNF- $\alpha$  is produced by various immune cells and plays an important role in regulating inflammatory responses. TNF- $\alpha$  inhibitors have been shown to be effective in the treatment of various autoimmune diseases. (Bradley,2008; Jang et al, 2021). IL-6 is another proinflammatory cytokine that has pleiotropic effects on inflammation and immune response (Gabay, 2006). IL-17, mainly produced by Th17 cells, also has proinflammatory effects and can alter the integrity of the blood-brain barrier, contributing to the inflammatory response in the central nervous system (Cipollini et al, 2019). Previous studies have demonstrated that both in human brain endothelial cells and murine brain endothelial cell lines, IL-17 disrupts the integrity of the blood-brain barrier (BBB) through the activation of receptors that increase permeability (Kebir et al., 2007, Huppert et al., 2010). Following the induction of cytokines IL-17 and IL-22, BBB endothelial cells secrete CCL2 (or MCP-1), promoting the infiltration of CD4<sup>+</sup> lymphocytes (Kebir et al., 2007).

In addition to proinflammatory cytokines, there are also cytokines with anti-inflammatory effects, such as interleukin-10 (IL-10) and interleukin-13 (IL-13). IL-10 is produced by non-classical monocytes (anti-inflammatory), as well as B and T lymphocytes, primarily regulatory T cells. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that helps to maintain immune

homeostasis. However, it exhibits pleiotropic functions and can actually promote immune responses by supporting the activation of B cells and CD8<sup>+</sup> T cells (Bedke et al., 2019). The cytokine IL-13, released by Th2 cells, has anti-inflammatory action by inhibiting various pro-inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  (Miossec and van den Berg, 1997). This cytokine may have protective effects in certain neuroinflammatory disorders (Hamzei Taj et al., 2018). In addition, IL-13 induces tissue fibrosis by stimulating and activating TGF $\beta$  (Lee et al., 2001).

### ***1.5 Immune system in NAFLD***

The immune system plays an important role in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). During the early stages of the disease, activation and recruitment of immune cells in the liver can promote inflammatory response and cellular injury, leading to disease progression. Innate immunity, mediated by pattern recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs) and NOD-like receptors (NLRs), is activated in response to molecules derived from pathogenic microorganisms or cellular damage. Kupffer cells (KC) and hepatic stellate cells (HSC) are activated in response to these signals and promote inflammation and fibrosis, respectively. In the acute phase of the disease, KCs polarize to their activated pro-inflammatory phenotype (M1) and secrete pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and the chemokines CCL2 and CCL5, promoting NASH progression. However, in the chronic phase, KCs present a different phenotype, as most of these cells polarize to their anti-inflammatory phenotype (M2), releasing anti-inflammatory cytokines such as IL-13, IL-10, IL-4, and TGF- $\alpha$  and interacting reciprocally with Th2 cells. Further studies are needed to understand the specific mechanisms by which liver macrophages change their phenotype in advanced stages of NASH.

In physiological conditions, HSC are in their quiescent state (qHSCs, quiescent-HSCs) with high IFN- $\gamma$  production through TLR3 expression. During the chronic phase of NASH, HSCs are activated and differentiate into myofibroblasts, lose the ability to produce IFN- $\gamma$  and are considered the main drivers of liver fibrosis. Natural killer T (NKT) cells increase during NASH disease contributing to inflammation and fibrosis by secretion of IL-4, IFN- $\gamma$ , and

## Summary

osteopontin (OPN), a proinflammatory cytokine involved in early T cell activation and B cell proliferation and thus antibody secretion (Arrese et al.,2016). Dendritic cells (DCs) are responsible for the connection between innate and adaptive responses. In a proinflammatory environment due to NASH triggering, DCs mature and secrete proinflammatory cytokines, inducing the adaptive immune response by activation of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells and cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells (Lukacs-Kornek et al.,2013). Through MHC class I and II molecules, DCs present antigens to TCR receptors, CD4<sup>+</sup> cell receptors, and CD3 co-receptor, favoring the activation of Th1 and Th17 cells (Sutti et al.,2020). Different studies have associated the development of hepatic steatohepatitis with an increase in Th17 cells, and thus increased expression of IL-17 and IL-22 (Giles et al.,2016; Rollas et al.,2016).

As for cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells, their role is unclear and further studies are required to confirm their role in pathology progression. In animal models and in humans, a significant hepatic infiltration of these cells has been demonstrated during the progression from NAFL to NASH. Furthermore, it has been suggested that CD8<sup>+</sup> may interfere with the initiation of inflammation by activation of HSCs (Bhattacharjee et al.,2017; Wolf et al.,2014).

As for B cells, their function in NAFLD and NASH is still unclear, but it has been suggested that they may promote fibrosis and inflammation through cytokine production and antibody generation. B cell activation can occur through antigen recognition or signals derived from changes in the gut microbiota.

B cells can promote hepatic fibrogenesis, as demonstrated in a study on mice treated with B cell deficient CCL4 (Thapa et al., 2015).

In a study with mice fed a high-fat diet to induce NAFLD, was shown that intrahepatic B cells secreted higher levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  compared to the control group and promoted the differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells into Th1 cells (Zhang et al., 2016). Subsequently, Bruzzi et al. demonstrated the presence of B cells in lymphocyte-rich cellular aggregates in liver biopsies from NASH patients, suggesting a possible role of B cells in the activation of the cellular response. In these subjects, the infiltration of B/T lymphocytes correlated with circulating IgG levels targeting oxidative stress-derived epitopes (OSE) as well as IFN- $\gamma$  levels (Bruzzi et al., 2018).

However, B cell activation can also occur in an antigen-specific manner through B cell receptor (BCR) signaling (Barrow et al., 2021).

B cell activating factor (BAFF), belonging to the TNF family, is a cytokine involved in B cell maturation and survival. Findings in both animal models and humans suggest direct effects of BAFF on the development of liver disease and adipose tissue metabolism, or indirect effects mediated by B cell survival and maturation (Bruzzi et al., 2018; Nakamura et al., 2019; Miyake et al., 2013).

Alternatively, changes in the gut microbiota in NAFLD can influence B cell activation through mechanisms independent of antigen translocation. Increased bacterial translocation through a TLR4-dependent mechanism, signaling via MyD88, can activate B cells (Barrow et al., 2021). The mechanisms of B cell-mediated HSC activation leading to fibrosis in NASH are still unknown.

### ***1.6 Role of peripheral inflammation in cognitive decline associated with liver disease***

The development of cognitive impairment in patients with liver cirrhosis is associated with specific alterations in the immune system and peripheral inflammation. (Mangas-Losada et al. 2017).

Mangas-Losada et al., conducted a study demonstrating that patients with minimal hepatic encephalopathy (MHE) exhibit a proinflammatory environment characterized by a significant increase in various proinflammatory cytokines compared to patients without MHE. Higher proportions of pro-inflammatory monocytes and memory and autoreactive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was associated with a higher concentration of CX3CL1 and IL-15, which may facilitate their infiltration into the brain. Additionally, patients with MHE showed increased expression of the early activation marker, CD69, in all subtypes of CD4<sup>+</sup> T cells and B lymphocytes. Increased B-cell activation correlated with elevated serum IgG levels in this group of patients. Finally, they showed an increase in the differentiation of CD4<sup>+</sup> lymphocytes towards the Th22 and Tfh subtypes, with greater expression of the transcription factors AHR and BCL6, respectively, in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). These factors could promote the formation of tertiary lymphoid organs in the brain.

## Summary

Based on these findings, were proposed to contribute to the development of neuroinflammation and neurological deterioration in cirrhotic patients with MHE: (1) infiltration of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes into the brain ;(2) activation of endothelial cell receptors by peripheral interleukins (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) leading to the release of inflammatory factors in the brain; (3) infiltration of Tfh lymphocytes and formation of tertiary lymphoid organs containing B cells, which may have germinal centers (Mangas-Losada et al., 2017a).

## 2. Hypotheses and objectives

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is now recognized as the liver component of the metabolic syndrome. The features associated with NAFLD, and the metabolic syndrome have often been linked to cognitive dysfunction. However, recent studies suggest that NAFLD may be a cause of cognitive dysfunction independently of these factors. In addition, NAFLD presents with dysbiosis of the gut microbiota and impaired urea cycle function, promoting systemic ammonium accumulation, which would further promote systemic inflammation.

Although several studies have already attempted to assess possible cognitive impairment in patients with NAFLD, the methodology to characterize and detect cognitive impairment in these patients is not yet well defined, although the possible mechanisms involved in the development of cognitive impairment in patients with NAFLD are not yet known.

Based on the above, the following hypotheses have been put forward:

- ❖ NAFLD patients may develop mild cognitive impairment, which could be detected by a score based on specific psychometric tests.
- ❖ As in cirrhotic patients, the occurrence of mild cognitive impairment in NAFLD patients could be associated with specific qualitative changes in peripheral inflammation and in the immune system that could trigger the induction of cognitive and motor impairment.

The aim of this doctoral thesis is to develop a new methodology to characterize mild cognitive impairment in patients with NAFLD and to identify possible changes in peripheral inflammation associated with the presence of cognitive and motor impairment in these patients.

To achieve these goals, we addressed several specific objectives:

- ✓ Characterization of the different neurological alterations in patients with NAFLD using psychometric tests that assess specific cognitive and motor functions.
- ✓ Developing a score based on the cognitive and motor impairments detected to classify patients with NAFLD according to the presence or absence of mild cognitive impairment (MCI).
- ✓ Characterization of the immune system alterations in patients with NAFLD without and with MCI, by analyzing changes in the immunophenotype and possible alterations in different blood populations.
- ✓ Characterization of the changes in peripheral inflammation in patients with NAFLD without and with MCI, analyzing the profile of pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma.
- ✓ Correlating the observed changes in peripheral inflammation and immunophenotype to the neurological alterations associated with the onset of MCI.
- ✓ To study the influence of liver damage on the observed alterations.
- ✓ To study the ability of altered parameters to diagnose the presence of MCI.

### 3. Materials and methods

#### *3.1 Patients and Controls*

A total of 73 patients with NAFLD were consecutively recruited from the outpatient clinics of the Clínico and Arnau de Vilanova hospitals in Valencia, Spain. The diagnosis of NAFLD was determined based on clinical, biochemical, and ultrasound data. Exclusion criteria were psychiatric or neurological diseases; recent (<6 weeks) use of medications that affect cognitive function; recent (<6 months) alcohol consumption; recent (<6 weeks) antibiotic use or gastrointestinal bleeding; other liver disease or hepatocellular carcinoma. A total of 61 healthy volunteers were included in the study after ruling out liver disease through clinical, analytical, and serological tests. Participants did not have fever or any clinical or biological signs of recent infection. Blood ammonia levels were measured immediately after blood collection with the PocketChemBA System Ammonia II Test Kit

## Summary

(Arkay, Inc., Kyoto, Japan) on the same day as psychometric tests were performed. All participants signed written informed consent before participating in the study. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Scientific and Research Ethics Committees of Hospital Clínico Universitario and Arnau de Vilanova Hospital of Valencia, Valencia, Spain (approval code: 2018/123; approval date: 25 July 2019).

### ***3.2 NAFLD Patient classification into NAFL or NASH***

Liver biopsies were available in 48 of the 73 NAFLD patients, who were classified as NAFL or NASH using the NAFLD activity score (NAS) (Kleiner et al., 2005). Biopsy extraction was not clinically justified in the remaining 25 patients, who were classified according to the FibroScan-AST (FAST) score.

### ***3.3 Neuropsychological assessment***

Initially, patients performed the Psychometric Hepatic Encephalopathy Score (PHES) battery, which is considered the gold standard for the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy (MHE) in patients with liver cirrhosis. However, since the PHES may not detect all neurological deficits, we also performed additional psychometric tests, such as the Digit Symbol Digital Modalities Test (SDMT), the d2 test, the digit span test, and assessments of visuomotor and bimanual coordination, for both patients and control subjects, as detailed below.

#### **3.3.1 PHES**

PHES consist of five psychometric tests: Digit symbol test (DST), number connection test A (NCT-A), number connection test B (NCT-B), serial dotting test (SD), and line tracing test (LTT) [18]. The PHES score was calculated adjusting for age and education level using Spanish normality tables ([http://www.redeh.org/TEST\\_phes.htm](http://www.redeh.org/TEST_phes.htm) accessed on 25 June 2021). Patients were considered to have MHE when the score was  $\leq -4$  points (Wesseinborn et al., 2001; Ferenci et al., 2002).

### **3.3.2 d2 Test**

This test evaluates selective/sustained attention and mental concentration and provides scores that reflect three aspects of attentional behavior: the speed or quantity of work completed within a given time, the accuracy of the work, and the relationship between speed and accuracy. The d2 test was conducted following the methodology described in (Bates y Lemay, 2004; Brickenkamp, 1998, 2009) using the following parameters: Total number of characters processed (TR); right answers (RA) (number of characters correctly cancelled), omission errors (O) (number of target symbols not cancelled); commission errors (C) (number of non-target symbols cancelled); total errors (O\_C) (sum of omission and commission errors); total correctly processed (TOT) (total characters processed minus total errors made); (CON) concentration performance (number of correctly minus incorrectly cancelled items).

### **3.3.3 Symbol Digit Modalities Test (Oral SDMT)**

This test evaluates focused selective attention and speed of information processing. It comprises a series of nine symbols, each associated with a single digit labeled 1–9. During the test, participants are presented with a series of symbols and are required to identify the correct corresponding number within a 90 second timeframe. The total of items, correct pairings, and errors are recorded (Smith, 1968).

### **3.3.4 Stroop Test**

Selective attention, psychomotor speed, cognitive flexibility, and inhibitory mental control were evaluated using a color-word version of the Stroop test. Participants performed the congruent, neutral, and incongruent tasks consecutively, with each task lasting 45 seconds, as described in (Glaser & Glaser, 1982; Golden, 2001). The number of correctly named items was adjusted based on age according to Spanish normatively tables.

### **3.3.5 Digit Span**

This test pertaining to the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS) (Wechsler, 1955) consists of two parts: ‘digits forward’, which evaluates verbal attention and ‘digits

## Summary

backward' evaluating immediate and working memory, which were performed as in (Giménez-Garzó et al, 2017).

### **3.3.6 Letter–Number Sequencing test**

The Letter–Number Sequencing test was performed as in (Egeland, 2015) and measures working memory, inducing a higher working memory load than digit span tasks.

### **3.3.7 Bimanual and Visual-Motor Coordination**

Tests Bimanual and visual-motor coordination tests were performed as in (Yela, 1955; Yela 1956) and time in minutes was recorded for each test.

### ***3.4. Procedure to classify NAFLD patients as with or without Mild Cognitive Impairment (MCI/NMCI)***

To classify NAFLD patients with or without cognitive impairment, firstly, the PHES was used as a reference. According to the PHES, only 12% of the NAFLD patients showed mild cognitive impairment. However, we observed that they performed significantly worse than controls on the other psychometric tests.

To identify NAFLD patients who performed poorly on each parameter measured by these tests, we applied the criterion of the mean plus or minus two times the Standard Deviation (SD) ( $\text{mean} \pm 2 \text{SD}$ ) This criterion has previously been used to identify patients with poor performance on psychometric tests (Sharma et al, 2010; Giménez-Garzó et al, 2017). Then it was graded according to Adams and Foley criteria (Adama & Foley 1953). The cut-off between normal and pathological results in the test battery was set at -5 points. We used these data to design a new score to classify patients as with MCI (mild cognitive impairment) or without MCI (NMCI).

### ***3.5 Characterization of leukocyte populations by flow cytometry***

For general study of leukocyte populations and subpopulations, venous blood samples were taken in BD Vacutainer® tubes with EDTA (Becton, Dickinson and Company, Franklin

## Summary

Lakes, NJ, USA). 50  $\mu$ L (100  $\mu$ L for study of B) cells population and subpopulation, of whole blood were incubated with a mixture of monoclonal antibodies specific for the different leukocyte subpopulations and with 2 mL BD FACS Lysing Solution (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Samples were incubated in the dark for 10 min at room temperature, after which, 50  $\mu$ L of Flow Count (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) was added to quantify the number of cells per microliter. T-helper lymphocyte (CD4<sup>+</sup>) subpopulations were studied in isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Dead cells were excluded from analysis by adding 100  $\mu$ L of Zombie Violet Fixable Viability Kit (Biolegend) to the samples as a viability marker, followed by incubation for 30 min in the dark at room temperature. PBMC were incubated with a mixture of monoclonal antibodies specific to the different CD4<sup>+</sup> cell subpopulations and with 2 mL VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter). For the study of Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Thf, the samples were incubated in the dark for 10 min at room temperature. While, for intracellular Tregs and IL-17, after lysis, we washed the cells with 2 mL of Stain Buffer (Human FoxP3 Buffer Set; BD Pharmingen) and added 2 mL of 1x Human FoxP3 Buffer A (Human FoxP3 Buffer Set; BD Pharmingen); we incubated the sample for 10 minutes in the dark at room temperature. After two washes with 2 mL of Stain Buffer we added 500  $\mu$ L of 1X Working Solution Human FoxP3 Buffer C (Human FoxP3 Buffer Set; BD Pharmingen) to permeabilize the cells. Incubate for 30 minutes in the dark at room temperature. We washed the cells with 2 mL of Stain Buffer, resuspended the cells and incubated for 30 minutes in the dark and at room temperature with the antibodies for intracellular markers present inside the cells. Next, 100  $\mu$ L of Flow Count (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) was added to quantify the number of cells per microliter. Analysis was performed with a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) and the Kaluza software package was used to analyze flow cytometry data.

### ***3.6. Monoclonal antibodies***

Different cell populations were labeled with antibodies against CD45 (total leukocytes), CD14 and CD16 (monocytes), CD3 (T lymphocytes), CD4 (T helper lymphocytes), CD4 (T cytotoxic lymphocytes), CD19 (B lymphocytes), CD69 (activated lymphocytes). Several

## Summary

populations of interest were identified from T lymphocytes (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>): autoreactive T helper lymphocytes (CD28<sup>-</sup>), naïve (CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup>) and memory T lymphocytes (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>), central memory (CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) and effector memory (CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>). Several populations of interest were identified from Thelper lymphocytes (CD4<sup>+</sup>): Thf (CXCR5), Th1 (CXCR5<sup>-</sup>/CXCR3<sup>+</sup>), Th2 (CXCR3<sup>-</sup>/CCR4<sup>+</sup>/CCR10<sup>+</sup>/CCR6<sup>-</sup>), Th22 (CXCR3<sup>-</sup>/CCR4<sup>+</sup>/CCR10<sup>+</sup>), Th17 (CCR4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>) and Tregs (CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>). Several populations of interest were identified from B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>): Plasmoblasts (CD27<sup>high</sup>/CD38<sup>+</sup>), B-lymphocytes, immature (CD27<sup>-</sup>/CD38<sup>+</sup>), Transitional B lymphocytes (CD27<sup>-</sup>/CD38<sup>+</sup>/IgM<sup>high</sup>/IgD<sup>+</sup>), Mature B lymphocytes (CD38<sup>-</sup>), all within the population of CD19<sup>+</sup> B lymphocytes. Naïve B lymphocytes (IgD<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>) and Memory B lymphocytes (CD27<sup>+</sup>) within the population of mature B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>). Unswitched B lymphocytes (IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>), B-lymphocytes switched (IgM<sup>-</sup>/IgD<sup>-</sup>), Double-negative switched B lymphocytes (CD27<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>/IgD<sup>-</sup>), within the memory B lymphocyte population (CD19<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD27<sup>+</sup>).

### *3.7 Determination of IgG plasma level*

Immunoglobulin G (IgG) levels were determined in plasma using the western blot technique. Once the plasma protein concentration was quantified by the BCA method, a volume corresponding to 80 µg of protein was loaded into a 12% polyacrylamide gel. We used the human anti-IgG antibody conjugated with alkaline phosphatase, mouse monoclonal, (Sigma ref. A2064) at a dilution of 1:80000.

### *3.8 Determination of plasma cytokine levels*

Blood samples were centrifuged for 10 min at 1.500× g to obtain plasma samples which were kept at -80 °C for subsequent cytokine analysis. Levels of IL-8, IL-18, IL-23, IL-4, TGF-β, IL-22, IL-1β, IL-10, IL-15, CCL20, CCL2, CCL5, CX3CL1 and BDNF were measured by DuoSet® ELISA Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). IL-13 levels were measured by the Human IL-13 ELISA kit (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). High sensitivity kits were required to evaluate IL-6 (Human IL-6 Quantikine HS ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Concentrations of TNF-α, IL-12p70,

IL-17A and IFN- $\gamma$  were measured with a cytokine 6-plex Panel 1 (TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-17A, IL-10, IL-6 and IFN- $\gamma$ ) (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF- $\alpha$ ) (Quanterix Corp., Billerica, MA, USA) using SIMOA SR-X equipment (Quanterix Corp., Billerica, MA, USA) Additional measurements for IL-17A were performed with IL-17A 2.0 Advantage Assay using SIMOA™ HD-X equipment (Quanterix Corp., Billerica, MA, USA).

### ***3.9. Analysis of transcription factors by quantitative PCR***

RNA was extracted from PBMC with a RNAspin mini-RNA isolation kit according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The RNA was retro-transcribed to cDNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For real-time PCR (40 cycles), Gene Expression Master Mix and the following Taqman® assays labeled with FAM dye were used: TBX21 (Hs00203436\_m1), GATA3 (Hs00231122\_m1), BCL6 (Hs00153368\_m1), RORC (Hs01076122\_m1), FOXP3 (Hs01085834\_m1) AHR (Hs00907314\_m1), CCR2 (Hs00704702\_s1), TLR2 (Hs01872448\_s1), and TLR4 (Hs00152939\_m1). The  $\Delta\Delta C_t$  method was used to determine the expression of the targets using HPRT1 (Hs02800695\_m1) as a housekeeping gene. All reagents were from Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, USA).

### ***3.10 Analysis of cytokines released by CD4<sup>+</sup> lymphocyte cultures***

CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes were isolated from frozen PBMC using the EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). CD4<sup>+</sup> cells were resuspended at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL in X-VIVO 20 Serum-Free media (Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland) supplemented with 1% penicillin/ streptomycin. CD4<sup>+</sup> cells (500.000 cells/well) were incubated in 48-well plates previously coated with anti-CD3 antibody (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with or without CD28 antibody (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) which induce cell activation. After 6 h of incubation at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>, supernatant and cell pellets were collected for further analysis. Cytokines IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  were measured in the culture

## Summary

supernatant by DuoSet® ELISA Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). For IL-13 measurement, Hu-man IL-13 ELISA kit was used (Invitrogen, Thermo Fisher, USA). IL-21 interleukin was measured in cell pellet by western blot (Abcam, ref. ab5978) at a dilution of 1:1500. The secondary antibody,  $\alpha$ -rbb, was from the commercial house Sigma, conjugated to alkaline phosphatase and the dilution used was 1:4000.

### *3.11 Statistical analysis*

Continuous variables were reported as mean and standard error of the mean (SEM) and comparisons performed using Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Tukey's multiple comparison test. Categorical data were analyzed by Chi-squared test. Bivariate correlations were evaluated using Spearman's Rho correlation test. Univariate and multivariate logistic regressions were performed using MCI as the dependent variable. Potential explanatory variables used on univariate analysis were those showing significant ( $p < 0.05$ ) differences between NMCI patients and MCI. Multivariate logistic regression analysis was performed including as independent variables those that were significant on univariate analysis. Receiver operating characteristic (ROC) curves were performed to determine the sensitivity and specificity of predictor variables found. Results were analyzed with GraphPad PRISM vs. 8 and SPSS vs. 28.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The probability level accepted for significance was  $p < 0.05$ .

## 4. Results

### *4.1 Design of a new score for the detection of mild cognitive impairment in patients with NAFLD*

In the first phase of the study, to classify NAFLD patients with or without mild cognitive impairment, we first used the PHES, as a reference with a cohort of 59 NAFLD patients and 53 healthy controls. According to the PHES, only 7 of the 59 patients with NAFLD (12%) had mild cognitive impairment. However, we observed that in other psychometric tests they performed significantly worse than controls.

To identify NAFLD patients who performed poorly on these tests, we applied the criterion of the mean plus or minus two times the Standard Deviation (SD) ( $\text{mean} \pm 2 \text{ SD}$ ), calculating the mean and SD of the value of each parameter for the control group and adding or subtracting twice the SD (depending on the parameter considered) from this mean to obtain a cut-off point.

From the cut-off point obtained for each parameter, we calculated the proportion of NAFLD patients with impaired performance on each task or parameter.

To develop the new score, we selected three parameters according to two criteria: they should be affected in a large percentage of NAFLD patients, and they should assess different aspects of neurological function. The combination of the selected parameters were the TA and CON parameters of the d2 test, which failed in 29 % of the patients, and the hits of the oral cue test, which failed in 32 % of the patients.

We then proceeded to assign a score according to the Adams and Foley method (Adams and Foley, 1952).

The cut-off between normal and pathological results in the test battery was set at -5 points.

According to this new score, patients were classified as "NMCI" when they scored greater than -5, or as "MCI" if their score was equal to or less than -5.

### ***4.2 Patient and Controls clinical characteristics***

Overall, 30% of patients (21 of 73) were classified as with MCI according to the new score showing a significantly lower score ( $-7.2 \pm 0.$ ) than was obtained by NMCI patients ( $-1.0 \pm 0.3$ ;  $p < 0.0001$ ) or controls ( $-0.8 \pm 0.3$ ;  $p < 0.0001$ ).

Patients with and without MCI, and controls had similar demographic (age and sex) and educational characteristics. Compared to the control group, NAFLD patients showed higher levels of markers of liver damage, such as AST and ALT ( $p=0.0012$  and  $p<0.0001$ , respectively). The total number of platelets in NAFLD patients with MCI was significantly increased compared to controls and patients without MCI ( $p<0.05$  and  $p<0.01$ , respectively).

## Summary

According to the NAS and FAST scores, 55% of patients were classified as NAFL (n = 39), and 45% as NASH (n = 32), and these were homogeneously distributed across the MCI and NMCI groups without significant statistical differences ( $p=0.630$ ).

### ***4.3 Study of cognitive and motor impairment in NAFLD patients classified according to the presence of MCI***

Once the patients were classified as MCI or NMCI according to this new score, we analyzed the alterations in different neurological functions in each patient group compared to healthy subjects. Patients with MCI performed worse than NMCI patients in all evaluated psychometric tests. This indicates that NAFLD patients with MCI show impaired selective attention, psychomotor velocity, cognitive flexibility, and inhibitory mental control as measured by the Stroop test and in Oral SDMT. Particularly, the Oral SDMT test reveals strong alterations in NAFLD patients with MCI in both total items and correct pairings parameters compared to controls and NMCI patients ( $p<0.0001$ ).

We showed a deficit in selective/sustained attention and mental concentration, speed or amount of work done, and accuracy of the work in MCI patients, but not in NMCI patients, as measured by the d2 test. Total responses (TR), right answers (RA), TOT (total correctly processed), and CON (concentration performance) were significantly reduced in MCI patients compared to NMCI patients and controls ( $p<0.0001$ ).

Concerning the Digit Span test and Letter–Number Sequencing Test, MCI NAFLD patients remembered a lower number of series than controls and NMCI NAFLD patients, indicates a deficit in working memory. Coordination was also impaired in NAFLD patients with MCI that needed more time to finish the tasks than controls or NMCI patients, in both the bimanual test and visual-motor test ( $p<0.0001$ ).

### ***4.4 Determination of ammonium levels in blood***

Due to liver damage, blood ammonium levels in NAFLD patients were significantly higher than in the control group (vs. NMCI  $p<0.01$ ; vs. MCI  $p<0.001$ ). Patients with mild cognitive

impairment had a higher mean ammonium level compared to the NMCI group, but without significant statistical differences.

### ***4.5 Monocyte populations in peripheral blood***

NAFLD patients showed an increased percentage of intermediate CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, pro-inflammatory monocytes compared to controls ( $p < 0.0001$ ). This increase was associated with a reduced percentage of classical, non-inflammatory CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes, with significant statistical differences in patients with MCI compared to control ( $p < 0.05$ ). Furthermore, NAFLD patients showed a significant decrease in the percentage of non-classical CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes compared to the control group ( $p < 0.0001$ ).

### ***4.6 Study of lymphocytes in peripheral blood***

- B lymphocytes: total population, subpopulations, and activation

Analysis of the total B lymphocyte population revealed no significant difference in the percentage of total lymphocytes between the study groups. Regarding their activation, due to the expression of the early biomarker CD69, NAFLD patients showed a higher proportion of activated cells compared to the control group, with a significant difference between patients without MCI and controls ( $p < 0.05$ ).

In the study of B-lymphocyte subpopulations, we analyzed the proportion of plasmoblasts, immature, transitional and mature B-lymphocytes in blood, but no significant differences were found between study subjects. The same is observed for *naïve* B cells, memory B cells, and in all subpopulations of memory B cells.

In terms of activation, the proportion of immature, transitional, and mature CD69 marked cells was significantly higher in NMCI patients compared to healthy subjects ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ , respectively). The proportion of immature and transitional CD69 marked cells was also higher in NMCI compared to MCI patients ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ , respectively). Similarly, a significant increase in activated memory B cells was detected in NMCI patients compared to the control group ( $p < 0.01$ ). Finally, the NMCI group presented a significantly

## Summary

higher percentage of activation in unswitched memory and switched double negative memory B cells than controls, while no differences in plasmoblasts, *naïve* B cells, and switched double negative memory cells were observed between the study groups.

However, since immunoglobulins are the main product of activated B lymphocytes, we measured by western blot the amount of IgG, both light (25 KDa) and heavy chain (50 KDa), present in the plasma of the study subjects. Although no significant differences in percentage and activation of the B-lymphocyte population were found in MCI patients, they showed a decrease in plasma IgG levels. For both light and heavy chain measures, we saw a significant decrease in MCI patients compared to controls ( $p < 0.01$ ). Patients with MCI also had a significant decrease over patients without MCI in heavy chain ( $p < 0.05$ ). In the case of NAFLD patients without MCI, both in light and heavy chains, no significant change was detected with respect to the control group.

- T lymphocytes (CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>): total population, subpopulations, and activation

In the analysis of the total T-lymphocyte population, no significant differences were observed in the total CD3<sup>+</sup> populations, nor in the proportions of T helper (CD4<sup>+</sup>) and cytotoxic (CD8<sup>+</sup>) T-lymphocytes. However, the percentage of cells positive for the early activation marker CD69 within the CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> populations was significantly increased in NAFLD patients compared to the control group ( $p < 0.0001$ ). In particular, the increase in both populations was significantly higher in patients with MCI compared to NMCI patients ( $p < 0.001$ ). As for activated CD8<sup>+</sup> cells, no significant differences in their activation were observed between the groups studied.

For a deeper analysis of CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes, we examined the distribution of naïve and memory lymphocytes as they lose CD45RA membrane protein and acquire CD45RO. In addition, we also studied the different subpopulations of memory lymphocytes, both central memory (CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) and effector memory (CCR7<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup>).

We observed no difference in the percentage of naïve and memory CD8 between NAFLD patients and controls. NAFLD patients showed a significant increase in the proportion of CD8<sup>+</sup> central memory cells and in parallel a significant decrease in CD8<sup>+</sup> effector memory cells with respect to the control group ( $p < 0.0001$ ). Finally, we studied the CD8<sup>+</sup> lymphocyte

population with respect to the presence or absence of the membrane protein CD28. CD28-negative CD8<sup>+</sup> lymphocytes are termed suppressor T lymphocytes and have a predominantly regulatory, rather than cytotoxic function like most CD8<sup>+</sup> lymphocytes. MCI patients had a significantly lower percentage of suppressor population compared to controls ( $p < 0.05$ ). In concordance, there is an increase, but no significant difference, in MCI patients in the CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> population.

In terms of activation, we observed that the percentage of CD69 cells within the naïve and memory CD8<sup>+</sup> populations was selectively increased in MCI patients compared to controls ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively). An exclusive increase in the percentage of activated memory cells is observed in MCI patients relative to NMCI patients ( $p < 0.05$ ). Overall, NAFLD patients showed a higher proportion of activated central and effector memory CD8<sup>+</sup> lymphocytes, with significant differences compared to healthy subjects ( $p < 0.0001$ ). The increase in activation was significantly higher in suppressor and non-suppressor CD8<sup>+</sup> lymphocytes of patients with MCI, relative to controls ( $p < 0.0001$ ). Also, we showed a significantly higher in CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> lymphocytes of patients with MCI, relative to patients NMCI ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively).

Patients with MCI showed a significantly higher percentage of memory CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes than control subjects ( $p < 0.05$ ) or NMCI patients ( $p < 0.05$ ). The percentage of naïve CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes tended to be reduced in parallel in MCI patients, indicating a shift from naïve to memory cells. NAFLD patients showed a significant increase in the proportion of CD4<sup>+</sup> central memory cells with respect to the control group (MCI:  $p < 0.001$  and NMCI:  $p < 0.01$ ) and a parallel decrease in CD4<sup>+</sup> effector memory cells, but without significant differences.

Most CD4<sup>+</sup> lymphocytes are also CD28<sup>+</sup> and require exposure to CD28 to activate. Some CD4<sup>+</sup> lymphocytes lack CD28 (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) and are considered autoreactive. The proportion of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> lymphocytes was lower in both MCI and NMCI patients compared with controls ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively). The percentage of non-autoreactive (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) T lymphocytes increased in parallel in patients without and with MCI compared to controls ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively).

## Summary

Early activation marker CD69 showed increased expression in CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes in both NMCI and MCI patients compared with the control group ( $p < 0.0001$ ) with higher activation in MCI than NMCI patients.

Both naïve and memory populations of CD4<sup>+</sup> cells expressed higher levels of CD69 activation marker in NAFLD patients than controls ( $p < 0.0001$ ). Furthermore, MCI patients showed greater activation than NMCI patients, in both naïve ( $p < 0.01$ ) and memory cells ( $p < 0.01$ ).

MCI and NMCI patients, compared to controls, exhibited a significant rise in CD69 expression in autoreactive cells ( $p < 0.0001$ ), but only MCI patients showed a CD69 increase in non-autoreactive cells compared with controls ( $p < 0.0001$ ). Moreover, both autoreactive and non-autoreactive cells were more activated in MCI than in NMCI patients ( $p < 0.001$ ).

In summary, our results indicate an activation of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes in MCI patients.

- Differentiation of T helper lymphocytes (CD4<sup>+</sup>) subtypes, and activation

Regarding the study of T-helper lymphocyte subsets, patients with MCI showed significantly heightened Thf differentiation and a lower percentage of Th1 cells compared to controls ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). Although there were no differences in Th17 cell percentages, CD69 expression increased in Th17 cells of patients with MCI compared with NMCI and control groups ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). Also, in patients with MCI showed a higher percentage of CD69 cells than controls in Th22 ( $p < 0.05$ ), Thf ( $p < 0.01$ ), Th2 ( $p < 0.01$ ), Tregs ( $p < 0.05$ ) and Th9 ( $p < 0.05$ ). However, in NAFLD patients without MCI we reported a higher significant percentage of CD69 cells than controls in Thf, Th2, and Th9 ( $p < 0.05$ ). It is noteworthy that activation of Th17 increased selectively in patients with MCI, but not in those without MCI, suggesting an association between activation of Th17 lymphocytes and appearance of MCI.

### ***4.7 Expression analysis of transcription factors characteristic of different CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyte Subsets***

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes may differentiate into different subsets, characterized by their expression of specific transcription factors and by production of certain cytokines. Transcription factor AHR, specific for Th22 lymphocytes, showed a non-significant trend of increased expression in MCI patients compared to control and NMCI groups, ( $p=0.112$  and  $p = 0.150$ , respectively), while transcription factor RORC, characteristic of Th17 cells, was significantly decreased compared to controls ( $p<0.05$ ). TBX21 and GATA3, specific for Th1 and Th2 lymphocytes respectively, showed significantly higher expression in NMCI patients than controls ( $p<0.05$ ), whereas expression of these transcription factors was significantly decreased ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$  respectively) in MCI patients compared to patients without MCI. No differences were found for FOXP3 and BCL6, markers of Tregs and Tfh. Expression of the chemokine receptor CCR2 was higher in PBMC from MCI patients than NMCI patients ( $p<0.05$ ) or controls ( $p<0.01$ ). No significant differences were found for TLR4 receptors, whereas in MCI patients, TLR2 was significantly increased compared to controls ( $p<0.05$ ).

### ***4.8 Plasma levels of different cytokines and chemokines***

We analyzed a wide pattern of different pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and chemokines in plasma from NAFLD patients and controls. Increases in IL-13, IL-23, IL-18, IL-22, IL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-21 and CCL20 were significantly greater in patients with MCI than in those without MCI or controls. BDNF was also increased in MCI compared to NMCI patients. In addition, NAFLD patients, with and without MCI, showed significantly increased IL-8, IL-10, TGF $\beta$ , IL-6, IL-21, CCL5, and CCL2 compared with control group, whereas plasma concentration of IL-1 $\beta$  was significantly heightened only in patients with MCI. No between-group differences were found in the plasma levels of IL-4, IL-15, IL-12 p-70, TNF- $\alpha$  or CX3CL1.

## Summary

### *4.9 Analysis of cytokines released by CD4<sup>+</sup> T cell cultures*

CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte subsets were best characterized by incubating isolated CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes in the absence or presence of added anti-CD28 and measuring the cytokines released to the culture media. Generally, no significant changes were observed in cytokines released from NMCI patients compared to controls, while a marked increase of several cytokines was found in patients with MCI. TNF $\alpha$ , IL-22, IL-17, and IL-13 release increased significantly after activation with anti-CD28 in cell cultures from MCI patients compared to CD4<sup>+</sup> cells from controls or NMCI patients. It is noteworthy that, in the absence of added anti-CD28, the release of IL-17 was already strongly increased in CD4<sup>+</sup> T cultures from MCI patients, but not from NMCI patients, suggesting an association between increased activation of Th17 lymphocytes and IL-17 production and appearance of MCI. TGF- $\beta$  increased in cultures from MCI patients in absence and presence of added anti-CD28, but the increase compared to patients without MCI only reached significance after activation. No differences were found for IL-21 and IL-1 $\beta$  in patients with MCI compared with controls. However, NMCI patients showed a significant increase in IL-1 $\beta$  release in both basal and activation conditions compared to patients with MCI.

### *4.10 Correlation analysis and logistic regression analyses of predictors for the presence of MCI in NAFLD patients*

In this study, we found significant correlations between several immunological and inflammatory parameters and the diagnostic score for mild cognitive impairment. To test the predictive ability of the parameters that correlate significantly with the new score, we analyzed a univariate logistic regression for each population and then performed a multivariate analysis with all significant parameters in the previous analysis.

On univariate analysis, MCI in NAFLD patients was significantly associated with blood platelets, plasma IL-13 levels, the expression of messenger RNA of the transcription factor GATA3, the percentage of activated CD3<sup>+</sup> cells and activated autoreactive cells (CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> CD69<sup>+</sup>) and the percentage of immature and transitional B lymphocytes. Multivariate logistic regression analysis, using the presence of MCI as the dependent variable and those

that were significant in univariate analyses as independent variables, showed that only IL-13 concentration was significantly associated with MCI in NAFLD patients NAFLD (OR: 1.391; confidence interval del 95%: 0.960-1.231;  $p = 0.021$ ).

Finally, we performed a ROC curve analysis of IL-13 for the diagnosis of MCI in NAFLD patients that showed an AUC value of 0.804 (95% confidence interval 0.680–0.928;  $p < 0.0001$ ). At the cutoff of 6.98 pg/mL, the specificity was 83% and the sensitivity was 68%.

## 5. Discussion

### *5.1 Cognitive and motor alterations in NAFLD patients with MCI*

This report shows that patients with NAFLD may present with MCI before reaching liver cirrhosis. Patients with NAFLD exhibit impairments in selective and sustained attention, mental concentration, work speed, and work accuracy, as assessed by the d2 test. They also show deficits in selective attention, psychomotor speed, cognitive flexibility, and inhibitory cognitive control, as evaluated by the Stroop test. Moreover, they display impaired selective attention, psychomotor speed, cognitive flexibility, and inhibitory control in the Oral SDMT test, as well as deficits in selective verbal attention and working memory in the Digit Span and Letter–Number sequencing tests, respectively. However, bimanual, and visual-motor coordination are only minimally affected.

To detect cognitive impairment in NAFLD patients, we developed a new score. which demonstrated higher sensitivity in detecting MCI compared to the PHES battery used for diagnosing MHE in cirrhotic patients. Approximately 10% of NAFLD patients (7 out of 73) were classified as having MCI based on the PHES, which is lower than the prevalence of MHE observed in cirrhotic patients (31-59%) when assessed using the PHES. (Giménez-Garzó et al., 2017; Mangas-Losada et al., 2019; Romero-Gómez et al., 2007; Maldonado-Garza et al., 2011). Other psychometric tests assessing various cognitive and motor functions could help detect cognitive impairment in NAFLD patients (Giménez-Garzó et al., 2017; Felipe V et al, 2012; Butz M et al, 2010). Using the criterion of the mean  $\pm$  2 SD (Sharma et al, 2010; Giménez-Garzó et al, 2017) the neurological functions most affected in

## Summary

our patients with NAFLD were selective attention and mental processing speed, assessed by the number of total hits obtained in Oral SDMT test, with impairment in 32% of patients, selective-sustained attention, assessed, in the d2 test, by the TA parameter (total number correct answers), with an impairment rate of 29% of patients, and concentration, with impairment in 29% of patients, assessed by the concentration index parameter (CON) in the d2 test. To improve the identification of NAFLD patients with MCI, a new score was developed considering patient performance on the three parameters with the highest proportion of impairment: TA, CON of the d2 test, and correct answers on the Oral SDMT test. All three parameters were age-adjusted using reference normality tables. Based on the scoring method by Adam and Foley, patients scoring -5 or lower were classified as having MCI. (Adams and Foley, 1952). Using this new score, 30% of NAFLD patients (22 out of 73) were classified as having MCI, further confirming its higher sensitivity compared to the PHES in detecting cognitive impairment in NAFLD patients.

The presence of MCI in patients with NAFLD does not directly solely depend on the severity of liver disease. No significant differences were observed in the performance on different psychometric tests between NAFL and NASH patients, suggesting that the presence or degree of MCI is not influenced by the specific subtype of NAFLD. Furthermore, the distribution of NAFL and NASH patients, in the groups of patients NMCI and MCI, was homogeneous, without some significant statistical differences. For this reason, all data of NAFLD patients are presented only classified as MCI and NMCI. Therefore, we can confirm that the incidence of MCI in NAFLD patients might depend on other factors in addition to the degree of liver disease. Additionally, comorbidities such as diabetes, metabolic syndrome, and hypertension were found to increase the prevalence of MCI in NAFLD patients, while dyslipidemia did not appear to have a significant influence. The data obtained showed that diabetes increased the prevalence of MCI from 19% in the absence of diabetes to 40% in its presence, while metabolic syndrome increased the prevalence from 21% in its absence to 36% in its presence. Similarly, the data showed an increased prevalence of MCI of 36% in the presence of hypertension compared to 24% in its absence.

In a previous study by our group in cirrhotic patients, we showed that the occurrence of MHE did not correlate with the severity of liver damage (MELD or Child-Pugh) but was associated with specific changes in immunophenotype and peripheral inflammation (Mangas-Losada et al, 2017). Similarly, while the prevalence of MCI is similar among NAFLD and NASH patients and cirrhotic patients with different MELD or Child-Pugh scores, the progression from NAFLD to cirrhosis significantly increases the prevalence of MCI or MHE. As mentioned above, the prevalence of MCI detected by PHES is 10% in NAFLD patients but is significantly higher (30-59%) in cirrhotic patients. The new developed score classifies 30% of NAFLD patients as MCI, a prevalence like that observed in patients with NAFL (59%) or NASH (41%). If a similar score is applied in cirrhotic patients, about 65% of individuals would be diagnosed with MCI (Giménez-Garzó et al, 2017). The data indicate that small differences in the severity of liver disease within NAFL and NASH patients or within cirrhotic patients with Child-Pugh A or B do not affect the occurrence or degree of MCI. However, the progression from NAFLD to cirrhosis clearly elevates the risk of MCI, likely due to changes in processes associated with MCI-MHE activation, such as inflammation, immunophenotype, or neuroinflammation. (Mangas-Losada et al,2017; Balzano et al, 2018; Cabrera-Pastor et al,2019).

### ***5.2 Hyperammonemia and inflammation in patients with NAFLD***

Recently, it has been shown that in the early stage of simple steatosis there is also an inhibition of ammonium detoxification through the urea cycle, leading to high levels of ammonia in the bloodstream (Lykke et al., 2019; Thomsen et al., 2014; De Chiara et al., 2018; Eriksen et al., 2019). However, limited knowledge exists regarding the correlation between ammonia and cognitive dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

In this study, patients with NAFLD exhibited hyperammonemia compared to healthy individuals. We did not find any significant differences in ammonia levels between patients with and without mild cognitive impairment (MCI).

In this thesis study, we analyze different proinflammatory and anti-inflammatory plasma cytokines associated with inflammation. Patients with MCI displayed elevated plasma levels of proinflammatory cytokines, including IL-23, IL-18, IL-22, IL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$ , and IL-

## Summary

21 and CCL20 in comparison to those NMCI. This suggests the presence of a systemic inflammatory response in MCI patients. IL-6 and IL-21 levels were also increased in patients without MCI compared to the control group. On the other hand, we observed that patients with MCI have elevated levels of the anti-inflammatory cytokine IL-13 which were predictive of cognitive decline in NAFLD patients. Both patients with and without MCI showed a significant increase in IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ , CCL2, and CCL5. Regarding plasma concentrations of IL-1 $\beta$  the increase, compared to the control group, was significant only in patients with MCI.

Additionally, the cytokines IL-10, IL-6, IL-13, IL17A, CCL2, CCL5, and CCL20 showed significant correlations with mild cognitive impairment according to the new scoring system, confirming that inflammation plays a crucial role in the development of neurological impairments in MCI patients.

The established correlations between all the studied inflammatory parameters and the results of the tests of attention, concentration, working memory, and motor coordination carried out in this study provide further evidence of the contribution of inflammation to cognitive and motor impairment.

In recent years, significant attention has been given to the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cognitive decline and HE. BDNF is a neurotrophin that plays an important role in the synthesis, differentiation, maintenance, and survival of neurons in both the central nervous system and the peripheral nervous system.

Previous studies have observed that BDNF levels are decreased in patients with MHE, and there is also an association between blood BDNF concentration. This suggests that the reduction in BDNF levels could contribute to the development of MHE and that it could be a potential biomarker of the disease (Stawicka et al., 2021).

However, plasma levels of BDNF are significantly higher in patients with MCI compared to patients NMCI.

These findings align with previous human data showing increased serum BDNF levels in preclinical and clinical stages of Alzheimer's disease (AD) and a significant increase in

BDNF concentration in brain regions such as the hippocampus and parietal cortex in the brains of people with AD. The authors suggest that this increase in BDNF reflects a compensatory mechanism of repair in the early and late stages of neurodegeneration, as well as a neuroprotective factor by contributing to the degradation of beta-amyloid, a protein associated with the formation of senile plaques in AD (Laskeet al, 2010; Angelucci et al, 2006; Durany et al, 2000).

Furthermore, an increase in CCL20 levels has been observed in patients with MCI compared to NMCI patients and to control group. CCL20 is a cytokine that may contribute to T cell infiltration, as reported in previous studies (Liao et al., 1999). In a previous study conducted by our group, we observed that CCL20 levels were increased in patients with MHE, suggesting its possible role in lymphocyte infiltration (Mangas et al, 2018).

As mentioned earlier, patients with NAFLD have similar levels of ammonia in their blood, but plasma cytokine levels were significantly increased in patients with MCI compared to patients without MCI. However, inflammation is associated with a broader range of neurological disorders beyond hyperammonemia. These results suggest that the degree of inflammation exerts a greater influence on the development of neurological disorders in NAFLD patients.

### ***5.3 Alterations in leukocyte populations in patients with NAFLD associated with the appearance of MCI***

The immune system plays a crucial role in the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and its activity varies throughout different stages of the disease. In the early stages of NAFLD, activation and recruitment of immune cells in the liver can trigger an inflammatory response that contributes to cell injury and death, thus promoting the progression of the disease, especially towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

Additionally, the combination of toxic lipid accumulation (lipotoxicity) and inflammation triggers an immune response by the hepatic cells, aiming to control and repair the damage incurred. It is important to note that this inflammation can spread beyond adipose and

## Summary

hepatic tissues, affecting other organs, such as the brain. Although the possibility of systemic inflammation playing a relevant role in the development of cognitive impairment in NAFLD has been proposed, the exact mechanism by which inflammation propagates to the brain is not yet fully understood (Miller and Spencer, 2014; Viscogliosi et al., 2013). In this regard, it is worth mentioning a previous study conducted by our group on the cerebellum of patients with different degrees of liver disease, from mild steatohepatitis to cirrhosis and hepatic encephalopathy. The reported results demonstrated that immune cell infiltration and subsequent neuroinflammation were also present in the cerebellum of patients with mild steatohepatitis (Balzano et al., 2018).

In this thesis work, we have shown that the emergence of cognitive impairment in patients with NAFLD is associated with specific changes in the immune system and inflammation, which differ from those found in patients without cognitive impairment and do not depend on the immune alterations underlying the progression of liver disease.

Regarding the analysis of the total population of leukocytes in peripheral blood, no significant differences were found between patients with NAFLD, both with and without mild cognitive impairment (MCI).

In terms of innate immunity, which constitutes the first line of defense, it was observed that patients with NAFLD had a higher proportion of monocytes with a proinflammatory phenotype known as intermediate monocytes. These monocytes are precursors of M1 macrophages, which are proinflammatory cells that produce various proinflammatory cytokines such as IL-6, IL-23, IL-18, IL-1 $\beta$ , and CCL20, contributing to the creation of a proinflammatory environment.

Furthermore, patients with NAFLD showed elevated levels of a protein called CCL2, also known as MCP-1, compared to the control group. Although patients with MCI had higher levels of CCL2 compared to NAFLD patients without MCI, no significant differences were observed. The expression of the mRNA receptor for CCL2, called CCR2, was also analyzed. It was found that patients with MCI had higher expression of CCR2 compared to patients without MCI and the control group. CCL2 is expressed in monocytes and T lymphocytes and is the most potent chemokine in regulating the migration and infiltration of

monocytes and macrophages (Sozzani et al., 1994). The CCR2 receptor plays an important role in certain neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and multiple sclerosis, where it mediates the abnormal migration of cells (Reale et al., 2019; Fantuzzi et al., 2008).

In Alzheimer's disease, CCL2 is primarily expressed in microglia and macrophages, which are involved in the clearance of  $\beta$ -amyloid protein, myelin degradation, and neuronal loss (Britschgi et al., 2007). Patients with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease have been found to have elevated levels of CCL2 in serum and cerebrospinal fluid, possibly representing an early event in the pathogenesis of Alzheimer's disease long before the clinical onset of the disease (Galimberti et al., 2006).

In models of liver inflammation, it has been discovered that microglia are activated and produce CCL2, promoting the infiltration of monocytes into the central nervous system (CNS) (D'Mello et al., 2009). The elevated levels of CCL2 and its receptor CCR2 in patients with NAFLD and mild cognitive impairment could facilitate the infiltration of monocytes into the CNS and cause neuroinflammation. Monocytes and macrophages play an important role as antigen-presenting cells along with lymphocytes, contributing to the increased lymphocyte activation observed in patients with MCI in NAFLD.

In terms of adaptive immune response, the responsible cells are B lymphocytes (humoral response) and T lymphocytes (cellular response), which include cytotoxic T lymphocytes (Tc), CD8<sup>+</sup>, and effector or helper T lymphocytes (Th), CD4<sup>+</sup>.

As mentioned earlier, in addition to generating antibodies, B lymphocytes actively participate in the regulation of the local immune response through various functions, such as antigen presentation to T cells (Molnarfi et al., 2013) and the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines that can, in turn, modulate the differentiation of CD4<sup>+</sup> T cell subsets (Li et al., 2015; Shen and Fillatreau, 2015). The results described in this study indicate that patients with MCI in the context of NAFLD do not show significant differences compared to the other study groups in the total count of B lymphocytes. However, a significant decrease was observed in the proportion of activated subpopulations of immature and transitional B cells and a decrease in plasma IgG levels compared to patients without MCI.

## Summary

Similarly, a recent study found a decrease in B cells and their immature and transitional cell subpopulations, associated with a decrease in Tfh cells, in patients with Parkinson's disease (Li et al., 2021). Although our study did not evaluate antigen-specific responses, it could be speculated that these abnormalities of B lymphocytes in patients with MCI may be related to alterations in the proportions of T cells, including the increased Th17 cells observed in patients with MCI.

Interestingly, in patients with NAFLD, CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes are altered in the same way in patients with MCI and patients without MCI. This suggests that CD8<sup>+</sup> do not seem to be directly involved in the development of mild cognitive impairment.

However, a significant increase was observed in the proportion of memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> lymphocytes in patients with MCI compared to the control group CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> lymphocytes, instead of having a cytotoxic function, have direct regulatory and suppressive function through cell-to-cell contact (Colovai et al., 2000) and the secretion of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, TGF- $\beta$ , and IFN- $\gamma$  (Balashov et al., 1995).

In patients with NAFLD and mild cognitive impairment, an increase in the early activation marker CD69 was observed in all populations of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. CD69 is an early activation marker on T lymphocytes that quickly appears on the surface of activated cells after interaction of the T cell receptor (TCR) with the peptide antigen (Vilanova et al., 1999). Several studies have reported the expression of CD69 in infiltrating lymphocytes in inflammatory sites in various chronic inflammatory diseases in humans (Afeltra et al., 1993; Crispin et al., 1998; Cibrián and Sánchez-Madrid, 2017). CD69 also regulates various specific functions of T cell subsets, such as the differentiation of regulatory T cells (Tregs) and the secretion of cytokines such as IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-22 (Cibrián and Sánchez-Madrid, 2017). All populations of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes showed significantly higher levels of the early activation marker CD69 in the group of patients with MCI compared to the other study groups. In particular, a higher activation was observed in autoreactive T lymphocytes, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>.

CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T lymphocytes have a highly proinflammatory and cytotoxic profile. They produce proinflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and express cytotoxic molecules such as granzyme B and perforin, which can directly lyse endothelial cells and damage tissues (Mou et al., 2014; Betjes et al., 2011). They also express CD161, a molecule that facilitates transendothelial migration and tissue invasion (Warrington et al., 2001).

However, the increased expression of CD69 on T lymphocytes in patients with MCI indicates an altered immune response and a possible role of signaling pathways in the pathogenesis of cognitive impairment in NAFLD.

In patients with NAFLD presenting with MCI, an association has been observed with elevated levels of various proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in plasma, as well as abnormal differentiation of CD4<sup>+</sup> effector T cell subsets.

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes play a crucial role in the adaptive immune system and in regulating immune response and inflammation. Their function depends on the antigenic signaling received and cytokines produced by antigen-presenting cells (APCs), as well as the intensity of T cell receptor (TCR) activation.

*Naïve* CD4<sup>+</sup> T lymphocytes can differentiate into specific subsets such as effector T helper cells (Th) and regulatory T cells (Tregs), which have specialized immunological functions and responses. These subsets are characterized by the expression of specific transcription factors, cell surface markers, and the production of key cytokines.

Effector T helper cells (Th) can be subtypes such as Th1, Th2, Th17, Th22, or Tfh, depending on the antigenic signals and cytokines present in the environment. On the other hand, regulatory T cells (Tregs) are responsible for maintaining proper immune balance.

To characterize the subsets of Th and Tregs cells in patients with and without mild cognitive impairment (MCI), key transcription factors, cytokines produced by isolated CD4<sup>+</sup> T cells, and the cytokine pattern in plasma were analyzed.

In the context of cognitive impairment in NAFLD, an increased activation of Th17 cells has been observed. Th17 cells are activated by a distinct set of proinflammatory cytokines, among which IL-6, IL-21, and IL-23 are essential for the development of Th17 cells.

## Summary

Th17 cells, while IL-17 is produced by Th17 cells (Ouyang et al., 2008). The key role of Th17 cells in the pathogenic mechanism of various inflammatory disorders and brain diseases, including multiple sclerosis, ischemic brain injury, and Alzheimer's disease, is well documented (Kebir et al., 2007; Oberstein et al., 2018; Dolati et al., 2018; Cipollini et al., 2019; Shi et al., 2022).

However, the pathogenic effect exerted by Th17 cells, and their characteristic cytokine IL-17, on the CNS remains poorly understood. Patients with MCI showed higher plasma levels of cytokines IL-6, IL-22, IL-23, and especially IL-17 compared to patients without MCI. Although we observed lower expression of the RORC transcription factor mRNA, a marker of Th17 cells, in PBMC, CD4<sup>+</sup> T cells isolated from patients with MCI released a higher amount of IL-17 in vitro, both in the absence and presence of CD28, compared to patients NMCI and the control group. Furthermore, Th17 cells, in the presence of the CD69 marker, were more activated in patients with MCI than in the other study groups. A recent study demonstrated the mechanisms of action of Th17 cells and IL-17 in the CNS (Kebir et al., 2007). The IL-17 receptor (IL-17R) is present in different types of cells in the CNS and circulating IL-17 causes disruption of the blood-brain barrier (BBB) by altering tight junctions and the expression of cell adhesion molecule in endothelial cells, promoting the entry of Th17 cells, neutrophils, and other peripheral immune cells into the CNS (Cipollini et al., 2019).

Peripheral CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, Th17, and Tfh cells were observed to infiltrate the cerebellar meninges of patients with steatohepatitis associated with microglial and astrocyte activation, as well as loss of Purkinje and granule neurons (Balzano et al., 2018). High plasma levels of IL-17 indicate Th17 activation in circulation and could cause disruption of the BBB and allow the infiltration of Th17 cells into the CNS, thus contributing to cognitive and motor impairments.

Patients with NAFLD showed a higher activation toward Th2 cells in the presence of CD69 compared to the control group, but without significant differences between the group with and without MCI. On the other hand, in patients with MCI, we observed a significantly lower expression of the GATA3 transcription factor, a marker of Th2 cells, compared to

patients without MCI. However, we observed that CD4<sup>+</sup> T lymphocytes isolated from patients with MCI released higher amounts of IL-13 compared to patients without MCI. As we have mentioned, plasma levels of the anti-inflammatory cytokine IL-13 were significantly increased in patients with MCI, which was predictive of cognitive impairment in NAFLD patients. IL-13 is a cytokine associated with the Th2 immune response and has been linked to the regulation of immune response and inflammation in various pathological contexts. Previous studies have established an association between IL-13 levels and the progression from NAFLD to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Patients with NASH have higher levels of IL-13 compared to patients with NAFLD, suggesting that this cytokine may play a role in the progression of liver disease.

However, IL-13 is involved in the induction of fibrosis through the stimulation of TGFβ production, which is involved in promoting liver fibrosis (Liu et al., 2012; Lee et al., 2001). This cytokine, due to its anti-inflammatory properties, inhibits the production of proinflammatory mediators such as IL-1β and TNF-α. Additionally, it has been reported that IL-13 antagonizes the effects of interferon gamma (IFN-γ), another proinflammatory cytokine (Miossec and van den Berg, 1997; Kolosowska et al., 2019).

A study by Newcomb et al. demonstrated for the first time that human Th17 cells express IL-13Rα1 and that IL-13 is important in the negative regulation of Th17 cytokine production (Newcomb et al., 2011).

Previous studies have shown that IL-13 can modulate the activation of microglial cells and macrophages, leading them towards a protective phenotype similar to M2 polarization in neurodegenerative disorders (Hamzei Taj et al., 2018; Gordon, 2003). Its elevated production in patients with MCI could represent a mechanism of regulatory and compensatory response to counteract inflammation and neuronal damage associated with cognitive impairment in NAFLD, contributing to neuronal protection.

Regarding Th1 cells, patients with MCI had a lower percentage of these cells compared to controls, while no significant differences were found between the study groups in the percentage of activated Th1 cells. Furthermore, the expression of the transcription factor, a marker of these cells, TBX21, in PBMC was decreased in patients with MCI compared to

## Summary

patients without MCI, who had higher expression levels also compared to the control group. Th1 cells are known to be major sources of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-12 in immune response and inflammation. Plasma concentrations of IFN- $\gamma$  in patients with MCI were higher than in patients with NAFLD without MCI and the control group. On the other hand, levels of TNF- $\alpha$  and IL-12 were similar in all study groups. However, in isolated CD4<sup>+</sup> T cells from patients with MCI, the release of TNF- $\alpha$  in vitro, in the presence of CD28, was significantly increased compared to patients without MCI and healthy subjects.

The involvement of Th22 cells in the pathogenesis and neurological alterations of autoimmune diseases and MHE has been demonstrated in previous studies (Azizi et al., 2015; Mangas et al., 2018).

IL-22 plays an important role in the formation of tertiary lymphoid organs (TLOs) in autoimmune diseases. This cytokine promotes the expression of CXCL13, which is crucial for recruiting B cells and Tfh cells and for the formation of TLOs. These processes contribute to B cell activation and immune cell infiltration in autoimmune diseases (Barone et al., 2015).

In cirrhotic patients with MHE, the increased Th22 cells may contribute to the formation of TLOs, activation of B lymphocytes, antibody production, and thus facilitate the infiltration of immune cells into the brain, which could be one of the causes of cognitive impairment in MHE patients (Mangas et al., 2018).

Furthermore, recent studies have demonstrated an association between the transcription factor AHR, a marker of Th22 cells, and brain aging in humans, as well as in the development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and multiple sclerosis (Ramos-García et al., 1983).

Similarly, we could speculate that Th22 cells may be involved in the development of cognitive impairment in patients with NAFLD, although we did not detect any changes related to MCI in B lymphocytes.

In fact, patients with MCI, in the presence of the early activation marker, showed a greater differentiation towards Th22 cells compared to the control group. Messenger RNA

expression in NAFLD patients with MCI was increased compared to the other study groups, but without significant differences. Additionally, in addition to having higher plasma concentrations of IL-22 than patients without MCI and the control group, their CD4<sup>+</sup> T cells, in the presence of CD28, release higher amounts of IL-22 in vitro compared to the other study groups.

Regarding Tfh cells, patients with MCI had a higher percentage than the control group, even in the presence of the early activation marker CD69. However, we did not see significant differences between patients with NAFLD and the control group in both the expression of their transcription factor BCL6 and the levels of IL-21 released in CD4<sup>+</sup> cells in vitro. On the other hand, plasma levels of the cytokine IL-21 were significantly increased in patients with MCI compared to the group NMCI and healthy subjects. As mentioned for Th22 cells in MHE patients, Thf cells also participate in the formation of tertiary lymphoid organs (TLOs) and may contribute to neurological alterations in MHE patients through immune cell infiltration (Mangas et al., 2018).

Finally, regarding the proportion of Tregs cells, patients with MCI showed a higher proportion of activated Tregs cells with CD69 compared to the control group. However, there were no significant differences in the expression of FOXP3 mRNA, which is a key marker of Tregs cells. Additionally, plasma levels of TGF- $\beta$  were increased similarly in both groups of patients with and without MCI compared to the control group, and in isolated CD4<sup>+</sup> T cells from patients with MCI, the release of TGF- $\beta$  in vitro, under CD28 activation, increased. Different studies have demonstrated the regulatory role of TGF- $\beta$  in the immune system and its neuroprotective role in neurodegenerative diseases (Dobolyi et al., 2012).

These data suggest that although the proportion of Tregs cells may not be altered in patients with MCI, their activation state, indicated by CD69 expression, could be different. The increase in plasma levels of TGF- $\beta$  could be a compensatory response to counteract inflammation and neuronal damage associated with MCI.

The results of this study highlight specific changes in the immune system of patients with NAFLD and mild cognitive impairment, suggesting possible mechanisms involved in the development of this impairment. The main alterations associated with MCI include: 1)

## Summary

increased activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, as indicated by increased CD69 expression; 2) enhanced activation of Th17 cells and elevated plasma levels of IL-17, which may lead to disruption of the blood-brain barrier (BBB) and allow the entry of peripheral immune cells, including Th17 cells, into the CNS. Within the CNS, IL-17 has a direct effect on neurons and oligodendrocytes, causing damage, and activates astrocytes and microglia, promoting neuroinflammation; 3) elevated levels of IL-13, which may represent a compensatory anti-inflammatory response to increased expression of proinflammatory cytokines; 4) increased levels of CCL2 and CCR2, which may promote monocyte infiltration into the CNS.

In summary, this study provides relevant information about the immunological mechanisms and neurological alterations associated with cognitive impairment in patients with NAFLD. However, research in this field is still ongoing, and further scientific evidence is required to understand the underlying mechanisms. Understanding these immunological changes in patients with MCI and NAFLD is important for facilitating early diagnosis of cognitive impairment and developing therapeutic approaches aimed at modulating the inflammatory response and reversing associated neurological alterations.

## 6. Conclusions

1. We have developed a new scoring system to detect mild cognitive impairment in patients with NAFLD, using specific and sensitive psychometric tests to assess cognitive and motor functions.
2. Thirty percent of patients with NAFLD experience mild cognitive impairment, with impairments in attention, concentration, working memory, and motor coordination.
3. Inflammation plays a crucial role in the onset and progression of mild cognitive impairment in NAFLD and its associated neurological changes.
4. The degree of liver damage in patients with NAFLD does not determine the occurrence of mild cognitive impairment nor the changes in immunophenotype associated with this condition.
5. Patients with NAFLD show an increase in the number of pro-inflammatory monocytes in the blood and a pro-inflammatory environment in plasma, which influence the activation and differentiation of lymphocytes.

- 6.** Increased plasma levels of CCL2 and the expression of its receptor CCR2 in patients with mild cognitive impairment may promote the infiltration of monocytes into the CNS and trigger neuroinflammation.
- 7.** Patients with mild cognitive impairment show an increase in the activation state of various subtypes of T lymphocytes, as indicated by increased CD69 marker expression and pro-inflammatory plasma cytokines.
- 8.** Patients with mild cognitive impairment exhibit increased activation of Th17 cells and elevated plasma levels of IL-17, which could cause a disruption of the blood-brain barrier, facilitating the entry of peripheral immune cells, including Th17 cells, into the CNS, inducing neuroinflammation.
- 9.** The higher concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-13 in patients with mild cognitive impairment may be a regulatory and compensatory response to counteract the inflammation and neuronal damage associated with cognitive impairment in NAFLD.
- 10.** Patients with mild cognitive impairment display specific changes in their immunophenotype and peripheral inflammation that are associated with the development of neurological alterations in NAFLD.



## Abreviaturas

ALT Alanina Aminotransferasa

APC Célula presentadora de antígenos (*Antigen-Presenting Cell*)

ASC Célula secretora de anticuerpos (*Antibody Secreting Cell*)

AST Aspartato Aminotransferasa

BCR Receptor de células B (*B Cellular Receptor*)

BHE Barrera Hematoencefálica

BSA Albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

CAP Parámetro de atenuación controlado (*Controlled Attenuation Parameter*)

CD3 Clúster de diferenciación 3 (*Cluster of Differentiation 3*)

CHC Carcinoma Hepatocelular

DCL Deterioro Cognitivo Leve

DE Desviación Estándar

EA Enfermedad de Alzheimer

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

EEM Error Estándar de la Media

EH Encefalopatía Hepática

EHM Encefalopatía Hepática Mínima

HSC Células hepáticas estrelladas (*Hepatic Stellate Cells*)

Ig Inmunoglobulina

IL Interleucina

IMC Índice de Masa Corporal

INF- $\gamma$  Interferón Gamma

INR Ratio internacional normalizado (*International Normalized Ratio*)

JAK Cinasas Janus (*Janus kinases*)

## Abreviaturas

KC Células del Kupffer (*Kupffer Cells*)

LPS Lipopolisacárido

MELD *Model for End-stage Liver Disease*

MHC Complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)

NAFL Hígado graso no alcohólico (*Non-alcoholic fatty liver*)

NAFLD Enfermedad del hígado graso no alcohólico (*Non-alcoholic fatty liver disease*)

NAS *NAFLD Activity Score*

NASH Esteatohepatitis no alcohólica (*Non-alcoholic steatohepatitis*)

NK *Natural Killer*

NLR Receptores tipo NOD (*NOD-like Receptors*)

PAMP Patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PBMC Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PCR Proteína C Reactiva

PHES *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*

PRR Receptores de reconocimiento de patrón (*Pattern-recognition receptors*)

SNC Sistema Nervioso Central

STAT Transductor de señales y activador de la transcripción (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)

Tc Linfocitos T citotóxicos

TCR Receptor de células T (*T cells receptors*)

TGF- $\beta$  Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* )

Th Linfocitos T efectoros (*T lymphocytes helper*)

TLR Receptores de tipo Toll (*Toll-like Receptors*)

TNF- $\alpha$  Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* )

Tregs Células T reguladoras

VLDL Lipoproteínas de muy baja densidad (*Very Low-Density Lipoprotein*)

WHC Criterios de West Haven

# Índice



# Índice

<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1 El hígado y las enfermedades hepáticas.....</b>	<b>3</b>
1.1 <i>Enfermedad del hígado graso no alcohólico</i> .....	5
1.1.1 Epidemiología .....	6
1.1.2 Esteatosis hepática .....	8
1.1.3 Esteatohepatitis no alcohólica.....	9
1.1.4 Fibrogénesis hepática y progresión a cirrosis.....	10
1.1.5 Diagnóstico.....	12
1.1.6 Gestión y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.....	13
<b>2 Deterioro cognitivo en enfermedades hepáticas .....</b>	<b>13</b>
2.1 <i>Encefalopatía hepática</i> .....	13
2.1.1 Factores implicados en el desarrollo de la encefalopatía hepática....	16
2.2 <i>Deterioro cognitivo leve en NAFLD</i> .....	20
2.2.1 Posibles mecanismos implicados en la inducción del deterioro cognitivo en NAFLD.....	21
<b>3 El sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria .....</b>	<b>27</b>
3.1 <i>Respuesta inmune: innata y adaptativa</i> .....	28
3.1.1 Respuesta humoral .....	32
3.1.2 Respuesta celular .....	34
3.2 <i>Papel de los monocitos y macrófagos</i> .....	40
3.3 <i>Las citocinas: moduladores claves de la inmunidad</i> .....	42
3.4 <i>CD69: marcador temprano de activación</i> .....	47
3.5 <i>Papel de la inflamación periférica en el deterioro cognitivo asociado a la enfermedad hepática</i> .....	49
<b>4 Alteraciones en el sistema inmunológico en NAFLD .....</b>	<b>50</b>

## Índice

4.1	<i>Papel de la inmunidad innata en NAFLD</i> .....	51
4.2	<i>Papel de la inmunidad adaptativa en NAFLD</i> .....	52
<b>II.</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>57</b>
<b>III.</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>61</b>
<b>IV.</b>	<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>65</b>
<b>1</b>	<b>Pacientes y voluntarios sanos</b> .....	<b>67</b>
1.1	<i>Criterios de inclusión y exclusión</i> .....	67
1.2	<i>Extracción de sangre</i> .....	68
1.3	<i>Realización de los test psicométricos</i> .....	68
<b>2</b>	<b>Clasificación de pacientes con NAFLD según daño hepático, en NAFL y NASH</b> <b>68</b>	
<b>3</b>	<b>Obtención de muestras de suero y plasma</b> .....	<b>71</b>
<b>4</b>	<b>Medida de los niveles de amonio en sangre</b> .....	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>Test psicométricos para la evaluación neuropsicológica</b> .....	<b>72</b>
5.1	<i>PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score)</i> .....	72
5.2	<i>Estudio de alteraciones cognitivas</i> .....	74
5.2.1	Test d2.....	74
5.2.2	Test <i>Stroop</i> .....	76
5.2.3	Test oral de claves.....	78
5.2.4	Test oral de dígitos.....	79
5.2.5	Test oral de letras y números .....	80
5.3	<i>Estudio de alteraciones motoras</i> .....	81
5.3.1	Test de coordinación bimanual.....	81
5.3.2	Test de coordinación visuo-motora .....	82
<b>6</b>	<b>Diseño de una nueva puntuación para detectar el deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD</b> .....	<b>82</b>

<b>7</b>	<b>Aislamiento de células mononucleares (PBMC) de sangre total.....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Análisis del contenido de proteínas mediante la técnica de Western blot....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Aislamiento y activación de linfocitos T CD4+ in vitro a partir de PBMCs congelada .....</b>	<b>88</b>
9.1	<i>Aislamiento de linfocitos T CD4+.....</i>	88
9.2	<i>Cultivos celulares y activación de linfocitos T CD4+ in vitro.....</i>	90
<b>10</b>	<b>Determinación de los niveles de factores inflamatorios en plasma y en medio de cultivo.....</b>	<b>91</b>
10.1	<i>Medida de citocinas en plasma y medio de cultivo mediante ELISA.....</i>	91
10.2	<i>Determinación de los niveles de interleucina IL-21 en linfocitos T CD4+ ...</i>	94
10.3	<i>Medida de Inmunoglobulina G (IgG) en plasma por Western Blot.....</i>	95
<b>11</b>	<b>Medida de la expresión de factores de transcripción y receptores .....</b>	<b>95</b>
11.1	<i>Aislamiento del ARN total a partir de PBMC.....</i>	95
11.2	<i>Retrotranscripción del ARN .....</i>	96
11.3	<i>PCR cuantitativa (qPCR) .....</i>	96
<b>12</b>	<b>Análisis de poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo .....</b>	<b>98</b>
12.1	<i>Estudio cuantitativo de las poblaciones leucocitarias en sangre total .....</i>	99
12.1.1	<i>Análisis de poblaciones de monocitos.....</i>	100
12.1.2	<i>Estudio de linfocitos B.....</i>	101
12.2	<i>Estudio de subpoblaciones de linfocitos T.....</i>	104
12.2.1	<i>Estudio de subpoblaciones de linfocitos T en sangre total: linfocitos T naïve, de memoria y auto-reactivos.....</i>	105
12.2.2	<i>Estudio de los subtipos de linfocitos T helper en PBMC.....</i>	107
12.2.3	<i>Análisis de poblaciones de linfocitos Th1, Th2, Th9, Th foliculares, Th17 y Th22 .....</i>	107
<b>13</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>114</b>
<b>V.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>115</b>

## Índice

<b>1</b>	<b>Estudio de la cohorte de pacientes y controles .....</b>	<b>117</b>
1.1	<i>Características clínicas de los pacientes con NAFLD y sujetos control.....</i>	117
<b>2</b>	<b>Caracterización de las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes con NAFLD.....</b>	<b>119</b>
2.1	<i>Diseño de una nueva puntuación para la detección del deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD.....</i>	119
2.2	<i>Comparación de las alteraciones cognitivas en pacientes con NAFL y NASH´</i>	122
<b>3</b>	<b>Clasificación de los pacientes NAFLD según la presencia del deterioro cognitivo leve .....</b>	<b>124</b>
3.1	<i>Comparación de parámetros clínicos.....</i>	124
3.2	<i>Influencia de comorbilidades en la prevalencia de DCL en pacientes con NAFLD.....</i>	126
<b>4</b>	<b>Estudio de las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes NAFLD clasificados según la presencia de DCL.....</b>	<b>126</b>
4.1	<i>Batería de test psicométricos PHES.....</i>	128
4.2	<i>Atención selectiva y velocidad de procesamiento: Test de clave oral.....</i>	129
4.3	<i>Flexibilidad cognitiva y control inhibitorio verbal: Test Stroop.....</i>	130
4.4	<i>Atención selectiva- sostenida y concentración: Test d2.....</i>	131
4.5	<i>Memoria de trabajo: Test de dígitos y test oral de letras y números .....</i>	133
4.6	<i>Estudios de las alteraciones motoras: Test de coordinación .....</i>	134
<b>5</b>	<b>Determinación de los niveles de amonio en la sangre .....</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>Estudio de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica mediante citometría de flujo .....</b>	<b>136</b>
6.1	<i>Estudio de los monocitos en sangre periférica.....</i>	136
6.2	<i>Estudio de los linfocitos en sangre periférica.....</i>	138
6.2.1	<i>Linfocitos B.....</i>	138

6.3	<i>Linfocitos T.....</i>	144
<b>7</b>	<b>Estudio de la diferenciación de los distintos subtipos de linfocitos CD4+ ...</b>	<b>153</b>
7.1	<i>Análisis de los subtipos de los linfocitos T efectores mediante citometría de flujo</i>	154
7.2	<i>Análisis de la expresión de los factores de transcripción .....</i>	156
7.3	<i>Análisis de citocinas secretadas in vitro en cultivos de células T CD4+ ....</i>	158
<b>8</b>	<b>Estudio de la concentración de citocinas en el plasma.....</b>	<b>160</b>
<b>9</b>	<b>Expresión génica de receptores de membrana en PBMC .....</b>	<b>164</b>
<b>10</b>	<b>Estudio de la capacidad predictiva de los parámetros inmunológicos analizados para el diagnóstico del deterioro cognitivo en NAFLD .....</b>	<b>165</b>
10.1	<i>Análisis de correlaciones entre los parámetros inmunológicos y las alteraciones cognitivas y motoras.....</i>	165
10.1.1	<i>Alteraciones cognitivas .....</i>	165
10.1.2	<i>Alteraciones motoras .....</i>	172
10.2	<i>Análisis de correlaciones entre los parámetros analizados y el diagnóstico del deterioro cognitivo leve mediante la nueva puntuación .....</i>	174
<b>VI.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>179</b>
<b>1</b>	<b>Alteraciones cognitivas y motoras en pacientes NAFLD con DCL.....</b>	<b>181</b>
1.1	<i>Alteraciones cognitivas en pacientes con NAFLD.....</i>	183
1.1.1	<i>Atención selectiva y velocidad de procesamiento .....</i>	183
1.1.2	<i>Atención selectiva-sostenida y concentración mental .....</i>	183
1.1.3	<i>Memoria de trabajo .....</i>	184
1.2	<i>Alteraciones motoras .....</i>	184
1.3	<i>El daño hepático y el deterioro cognitivo leve .....</i>	185
<b>2</b>	<b>Hiperamonemia e inflamación en pacientes con NAFLD .....</b>	<b>188</b>
<b>3</b>	<b>Alteraciones en el inmunofenotipo e inflamación periférica en los pacientes con NAFLD y DCL.....</b>	<b>191</b>

## Índice

3.1 <i>Alteraciones en la diferenciación de los distintos subtipos de linfocitos CD4<sup>+</sup> asociadas a la aparición del DCL</i> .....	195
<b>VII. Conclusiones</b> .....	<b>203</b>
<b>VIII. Bibliografía</b> .....	<b>207</b>
<b>IX. Anexo</b> .....	<b>241</b>

<b>Tabla 1.</b> Clasificación WHC y ISHEN. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de la puntuación NAS (NAFLD Activity Score).....	69
<b>Tabla 3.</b> Estadios de fibrosis hepática según la clasificación según Kleiner et al. (1999)....	70
<b>Tabla 4.</b> Puntuación corregida según la edad de los parámetros del test de Stroop. ....	77
<b>Tabla 5.</b> Composición de las diferentes soluciones utilizadas en la separación y cuantificación de proteínas mediante western blot.....	88
<b>Tabla 6.</b> Kits ELISA DuoSet® (R&D Systems) utilizados en este estudio.....	93
<b>Tabla 7.</b> Kits ELISA comerciales utilizados para la determinación de IL13 e IL-6.....	93
<b>Tabla 8.</b> Sondas Taqman™ utilizadas para el estudio de factores de transcripción específicos de varias subpoblaciones de linfocitos T y receptores.....	97
<b>Tabla 9.</b> Sondas Taqman™ utilizadas para el análisis génica de los receptores de interés. .	98
<b>Tabla 10.</b> Anticuerpos utilizados para el análisis de poblaciones leucocitarias por citometría de flujo.....	99
<b>Tabla 11.</b> Anticuerpos utilizados para el análisis de poblaciones monocitos por citometría de flujo.....	100
<b>Tabla 12.</b> Anticuerpos utilizados para el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B por citometría de flujo.....	101
<b>Tabla 13.</b> Poblaciones de linfocitos B analizadas por citometría de flujo y los diferentes marcadores utilizados .....	104
<b>Tabla 14.</b> Panel de anticuerpos utilizados para el estudio de subpoblaciones de linfocitos T en sangre total.....	105
<b>Tabla 15.</b> Poblaciones de linfocitos T analizadas por citometría de flujo y los diferentes marcadores utilizados .....	106
<b>Tabla 16.</b> Panel de anticuerpos utilizados para el análisis de linfocitos Th1, Th2, Th9, Th foliculares, Th22 y Th17. ....	108

## Índice tablas

<b>Tabla 17.</b> Subpoblaciones de linfocitos T helper analizadas por citometría de flujo y los diferentes marcadores utilizados .....	109
<b>Tabla 18.</b> Panel de anticuerpos utilizados para el análisis de linfocitos Th17 y T reguladoras. ....	111
<b>Tabla 19.</b> Poblaciones de linfocitos Th17 y T reguladoras analizadas por citometría de flujo y los diferentes marcadores utilizados.....	112
<b>Tabla 20.</b> Características clínicas de los pacientes con NAFLD .....	118
<b>Tabla 21.</b> Corte y proporción de pacientes con NAFLD que muestran deterioro cognitivo para cada parámetro de las pruebas psicométricas .....	120
<b>Tabla 22.</b> Estudio de las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes con NAFL y NASH .....	123
<b>Tabla 23.</b> Características clínicas de los controles y pacientes clasificados por la presencia del deterioro cognitivo leve (DCL) .....	125
<b>Tabla 24.</b> Influencia de la diabetes, la hipertensión, la dislipemia y el síndrome metabólico en la prevalencia de DCL en pacientes con NAFLD.....	126
<b>Tabla 25.</b> Estudio de las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes NAFLD sin y con DCL .....	127
<b>Tabla 26.</b> Porcentaje de monocitos circulantes en pacientes y controles. ....	137
<b>Tabla 27.</b> Linfocitos B totales y su activación en pacientes y controles.....	139
<b>Tabla 28.</b> Subpoblaciones de linfocitos B y su activación en pacientes y controles. ....	142
<b>Tabla 29.</b> Linfocitos T totales y su activación en pacientes y controles.....	145
<b>Tabla 30.</b> Subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos y su activación en los tres grupos de estudio. ....	149
<b>Tabla 31.</b> Subpoblaciones de linfocitos T helper y su activación en los tres grupos de estudio. ....	153
<b>Tabla 32.</b> Porcentaje poblacional de los subtipos de linfocitos T helper y su activación en PBMC aisladas de los tres grupos de estudio.. ....	156

**Tabla 33.** Niveles de citocinas secretadas in vitro en cultivos de células T CD4<sup>+</sup> en ausencia (-) o presencia (+) de anti-CD28. .... 160

**Tabla 34.** Niveles plasmáticos de citocinas de control y pacientes. .... 163

**Tabla 35.** Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los test que evalúan la atención selectiva y velocidad de procesamiento (Test Stroop y Test de claves oral) ..... 167

**Tabla 36.** Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los subtest de la batería PHEs que evalúan la atención selectiva y velocidad de procesamiento. .... 168

**Tabla 37.** Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los test que evalúan la atención selectiva-sostenida y concentración mental. .... 170

**Tabla 38.** Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los test que evalúan la memoria del trabajo..... 172

**Tabla 39.** Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los test que evalúan las alteraciones motoras..... 173

**Tabla 40.** Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación utilizada para el diagnóstico de DCL. .... 174

**Tabla 41.** Análisis de regresión logística para evaluar la capacidad predictiva de los parámetros que contribuyen a la aparición del DCL en pacientes con NAFLD..... 176

## Índice figuras

<b>Figura 1.</b> El espectro de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease). .....	6
<b>Figura 2.</b> Prevalencia mundial estimada de NAFLD y distribución de genotipos PNPLA3..	7
<b>Figura 3.</b> Resumen de las principales vías que contribuyen a la acumulación de triglicéridos (TG) en NAFLD. ....	9
<b>Figura 4.</b> Posibles factores implicados en la inducción del deterioro cognitivo en NAFLD. ....	22
<b>Figura 5.</b> Sistema inmune innato y adaptativo. ....	28
<b>Figura 6.</b> Sistema inmune adaptativo: respuesta humoral y adaptativa. ....	31
<b>Figura 7.</b> Respuesta humoral: funciones de los anticuerpos. ....	33
<b>Figura 8.</b> Diferenciación de los linfocitos T helper. ....	37
<b>Figura 9.</b> La función principal de los macrófagos: opsonización y fagocitosis. ....	41
<b>Figura 10.</b> Esquema resumen de las alteraciones en el sistema inmunitario asociados a la aparición de la EHM. ....	50
<b>Figura 11.</b> El papel de las células B en la progresión de la NAFLD. ....	54
<b>Figura 12.</b> Batería de test psicométricos PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score).....	73
<b>Figura 13.</b> Test d2.....	75
<b>Figura 14.</b> Test Stroop .....	76
<b>Figura 15.</b> Test oral de claves.....	78
<b>Figura 16.</b> Test oral de dígitos.....	80
<b>Figura 17.</b> Test oral de letras y números. ....	81
<b>Figura 18.</b> Test de coordinación motora.....	82
<b>Figura 19.</b> Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por gradiente de densidad mediante Lymphoprep™. ....	83

**Figura 20.** Esquema general del aislamiento y activación de linfocitos CD4<sup>+</sup> in vitro a partir de PBMC congelados. .... 89

**Figura 21.** Ejemplo de pasos en el estudio de subpoblaciones de linfocitos B mediante citometría de flujo..... 103

**Figura 22.** Ejemplo de los pasos en el estudio de subpoblaciones de linfocitos T: Th1, Th2, Th9, Thf, Th22 y Th17 mediante citometría de flujo. .... 110

**Figura 23.** Ejemplo de los pasos en el estudio de subpoblaciones de linfocitos T: Th17 y Tregs mediante citometría de flujo..... 113

**Figura 24.** Resultados obtenidos en la batería de test psicométricos PHES..... 128

**Figura 25.** Resultados obtenidos en el test de claves oral. .... 130

**Figura 26.** Resultados obtenidos en el test Stroop..... 131

**Figura 27.** Resultados obtenidos en el test d2. .... 132

**Figura 28.** Resultados obtenidos en el test de dígitos y test de letras y números. .... 134

**Figura 29.** Resultados obtenidos en los test de coordinación bimanual y visuo-motora. .... 135

**Figura 30.** Niveles de amonio en sangre en pacientes con NAFLD y controles. .... 136

**Figura 31.** Poblaciones de monocitos en sangre periférica en pacientes con NAFLD y controles. .... 137

**Figura 32.** Población de linfocitos B totales y su activación en pacientes con NAFLD y controles.. .... 138

**Figura 33.** Subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con NAFLD y controles. 140

**Figura 34.** Activación de subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con NAFLD y controles. .... 141

**Figura 35.** Nivel de IgG en plasma de pacientes con NAFLD y controles.. .... 143

**Figura 36.** Población de linfocitos T totales y su activación en pacientes con NAFLD y controles. .... 144

**Figura 37.** Subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos en pacientes con NAFLD y controles.. .... 147

## Índice figuras

<b>Figura 38.</b> Activación de linfocitos T citotóxicos en pacientes con NAFLD y controles..	148
<b>Figura 39.</b> Subpoblaciones de linfocitos T helper en pacientes con NAFLD y controles..	151
<b>Figura 40.</b> Activación de linfocitos T helper en pacientes con NAFLD y controles. ....	152
<b>Figura 41.</b> Poblaciones de los subtipos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y su activación con el marcador CD69..	155
<b>Figura 42 .</b> Análisis de la expresión de factores de transcripción característicos para diferentes subconjuntos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	157
<b>Figura 43.</b> Niveles de citocinas secretadas in vitro en cultivos de células T CD4 <sup>+</sup> en ausencia (-) o presencia (+) de CD28. ....	159
<b>Figura 44.</b> Niveles plasmáticos de diferentes citocinas y quimiocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en pacientes con NAFLD y controles (A-B) .....	162
<b>Figura 45.</b> Análisis de la expresión de ARNm de los receptores TLR2, TLR4 y CCR2 en PBMC.....	164
<b>Figura 46.</b> Curva de características operativas del receptor (COR) para determinar la sensibilidad y especificidad de IL-13 en el diagnóstico del deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD.. ....	177
<b>Figura 47.</b> Esquema que resume los cambios en el inmunofenotipo y en la inflamación asociados al DCL en pacientes con NAFLD. ....	201

# I. Introducción



# 1 El hígado y las enfermedades hepáticas

El hígado es la glándula más grande del cuerpo humano y juega un papel vital en el metabolismo de los macronutrientes. Es el centro crítico de una serie de procesos fisiológicos, incluyendo el almacenamiento de glucógeno, la síntesis y degradación de proteínas plasmáticas (albúmina) y aminoácidos, la secreción de bilis, la homeostasis de los lípidos y del colesterol, y la eliminación de sustancias tóxicas de la sangre, incluidos muchos fármacos (Trefts et al., 2017).

El hígado está compuesto por diferentes tipos de células con funciones únicas y que ocupan alrededor del 78-84% del volumen hepático. El 16-22% restante del volumen hepático está formado por el espacio y la matriz extracelular (Rojkind et al., 1982). Los diferentes tipos celulares se clasifican en dos principales: las células parenquimatosas y las células no parenquimatosas. Las células parenquimatosas o hepatocitos son las de mayor tamaño y las más abundantes ya que representan el 60% de todas las células hepáticas. Las células no parenquimatosas, más pequeñas y de número inferior, son: las células epiteliales del conducto biliar o colangiocitos, las células sinusoidales o endoteliales, células estrelladas hepáticas (HSC, del inglés *Hepatic Stellate Cells*), células de Kupffer o macrófagos y las células NK hepáticas (del inglés *Natural Killer*) (LeCluyse et al., 2012). Las células estrelladas pueden existir en un estado inactivo, donde almacenan vitamina A, o, después de una lesión hepática, activarse a un fenotipo miofibroblástico caracterizado por una pérdida de vitamina A y expresión de actina de músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA). En este estado activado, las células estrelladas hepáticas miofibroblásticas (MF-HSC, del inglés *Myofibroblastic Hepatic Stellate Cells*) expresan factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) o factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), y citocinas, que regulan el crecimiento de los hepatocitos y la progresión de la respuesta fibrótica inflamatoria promoviendo la fibrogénesis. Además, las HSC están involucradas en el inicio y la progresión de la cirrosis, enfermedad hepática en etapa terminal, contribuyendo a la formación de tejido cicatricial, ya que son responsables del depósito y de la organización del

## Introducción

colágeno en el hígado lesionado (LeCluyse et al., 2012). Las células de Kupffer son la población de macrófagos residentes del hígado con una gran capacidad endocítica y fagocítica. Estas células participan en la modulación del recambio de hepatocitos por apoptosis, depurando la sangre que llega, a través de la circulación portal, a las células hepáticas. Además, juegan un papel muy importante en la vigilancia inmunológica y controlan la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria en la cicatrización de heridas hepáticas. Las células endoteliales sinusoidales del hígado son una población endotelial que tiene una cierta función de barrera. Las adherencias intercelulares entre las células endoteliales de los sinusoides hepáticos son mucho menos prominentes que las de las células endoteliales vasculares típicas, y su membrana plasmática se caracteriza por pequeños poros o fenestraciones, de 50 a 200 nm de diámetro, que permiten el intercambio de sustancias, dentro de estos límites de tamaño, entre el plasma y la superficie basolateral del hepatocito. El mayor acceso a la sangre permite una mayor oxigenación de los hepatocitos y una eliminación más eficiente de fármacos y otros xenobióticos. Finalmente, los colangiocitos son células epiteliales biliares que, como los hepatocitos, se originan a partir de hepatoblastos. (Trefts et al., 2017, LeCluyse et al., 2012).

Las múltiples funciones desempeñadas por el hígado, su estructura característica y su posición estratégica en el cuerpo humano, constituyen factores importantes que conducen a múltiples enfermedades hepáticas con diversas etiologías, y constituyen alrededor de la cuarta a quinta causa de muertes en todo el mundo. Además, el hígado es un órgano muy vulnerable, las infecciones virales, el abuso de alcohol, o drogas, el exceso de grasas en la dieta pueden causar daños y disfunciones.

Los parásitos y virus pueden infectar el hígado, causando inflamación que reduce la función hepática. Los tipos más comunes de infección hepática son los virus de la hepatitis, que incluyen: hepatitis A, hepatitis B y hepatitis C, hepatitis D y hepatitis E. Entre ellos, los más frecuentes son el virus de hepatitis B y C que se transmiten a través de la sangre y el suero (transfusiones, uso de jeringas infectadas) y las relaciones sexuales sin protección.

La cirrosis hepática es la consecuencia final de la inflamación crónica del hígado que destruye los hepatocitos y provoca cicatrices que reducen, también de forma irreversible, la

función del órgano. Si está muy avanzada, la cirrosis es potencialmente mortal. El alcoholismo, la fibrosis quística y las hepatitis virales son las causas principales de la cirrosis.

La acumulación de exceso de lípidos en el hígado conduce a la enfermedad del hígado graso. Esta patología puede ser de etiología alcohólica o no alcohólica, dependiendo si deriva del consumo o no de esta sustancia. Otras amenazas directas para el órgano son el cáncer y las enfermedades autoinmunes.

### 1.1 Enfermedad del hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico, (NAFLD, *Non-alcoholic fatty liver disease*, por sus siglas en inglés), se caracteriza por un depósito excesivo de lípidos en el hígado (esteatosis macrovesicular) en más del 5 % de los hepatocitos, en ausencia de un consumo significativo de alcohol o causas alternativas. La NAFLD abarca un espectro de enfermedades que varía desde la esteatosis simple, también conocida como hígado graso no alcohólico (NAFL, *Non-alcoholic fatty liver*, por sus siglas en inglés) a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, *Non-alcoholic steatohepatitis*), y el desarrollo de fibrosis, que puede progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC) (Figura 1) (Serfaty et al, 2008).

Aunque sigue siendo difícil, sería importante distinguir antemano, entre pacientes con esteatosis simple no progresiva y pacientes con NASH con alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares o aquellos con riesgo de desarrollar cirrosis y CHC. De esta manera, se podría evitar la progresión de NAFLD a una enfermedad hepática más grave, y por lo tanto controlar la aparición de complicaciones graves como ascitis, varices esofágicas, encefalopatía hepática, CHC e insuficiencia hepática

## Introducción

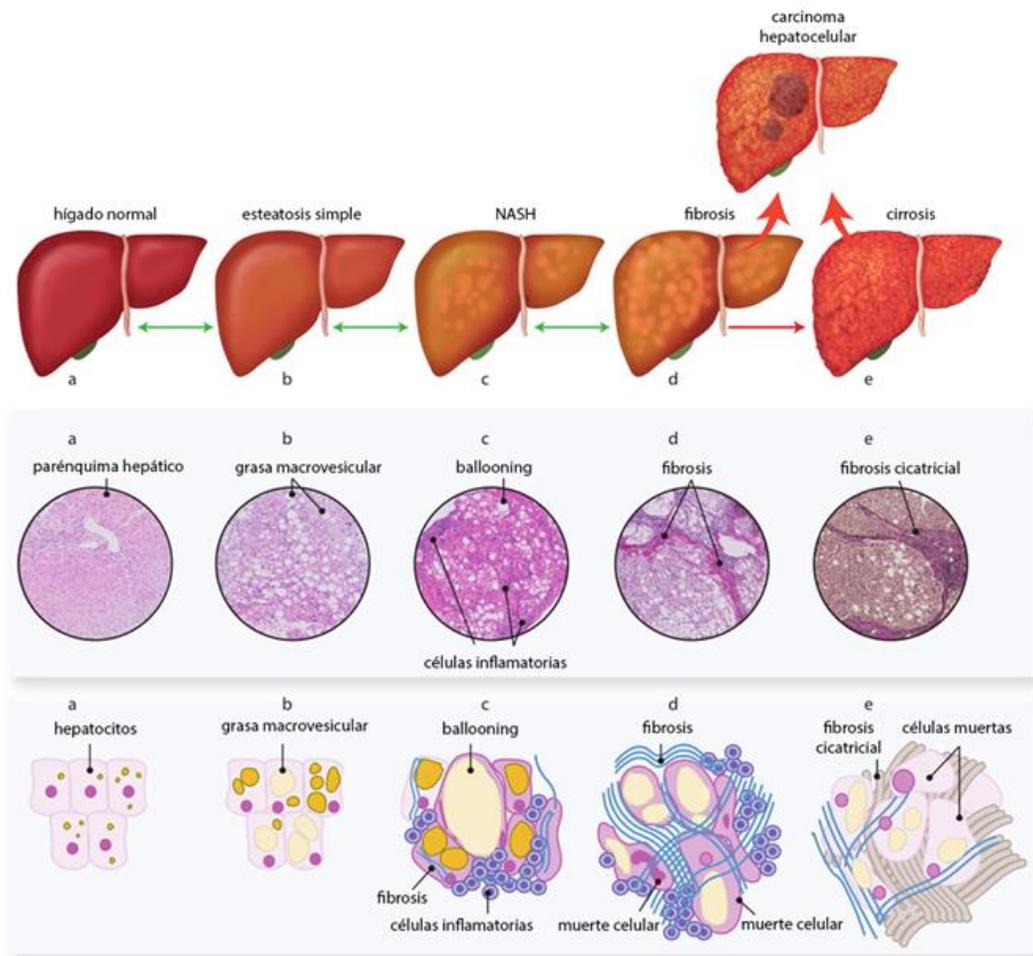
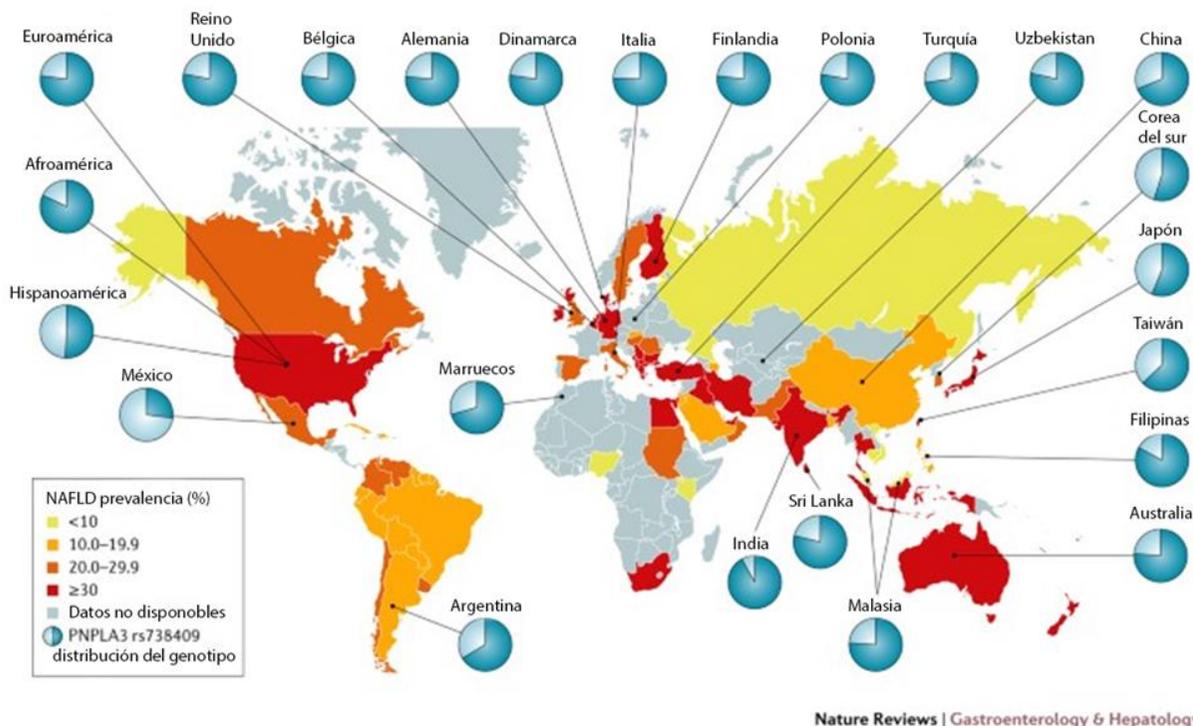


Figura 1. El espectro de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease). (Modificado de European Journal of Endocrinology 183, 3; 10.1530/EJE-20-0065)

### 1.1.1 Epidemiología

NAFLD se ha convertido en una de las enfermedades hepáticas crónicas más comunes. La prevalencia mundial de la NAFLD es de alrededor del 25%, oscilando entre el 13% en África y el 23% en Europa y el 32% en Oriente Medio (Figura 2) (Younossi et al., 2016).



**Figura 2. Prevalencia mundial estimada de NAFLD y distribución de genotipos PNPLA3.** PNPLA3 es un acrónimo que se refiere a un gen, llamado en inglés “*patatin like phospholipase domain-containing protein 3*” que codifica para la enzima-proteína llamada adiponutrina, involucrada en la obesidad y en el hígado graso. (Younossi et al.,2018).

Diferentes estudios han descrito variaciones raciales y étnicas en la progresión de la NAFLD, en particular se observa un aumento de la frecuencia en las poblaciones latinas y una disminución significativa entre los afroamericanos, quizás debido a una mayor variación de riesgo genético asociados con la patología (Maurice y Manousou, 2018). Existe una estrecha asociación con dislipidemia, obesidad central, síndrome metabólico y diabetes mellitus de tipo 2, con una prevalencia del 69%, 51%, 43% y 23% respectivamente, entre los pacientes con NAFLD. Los factores de riesgo de enfermedad progresiva incluyen la edad, el aumento del IMC (índice de masa corporal) y la diabetes (Maurice y Manousou, 2018).

## Introducción

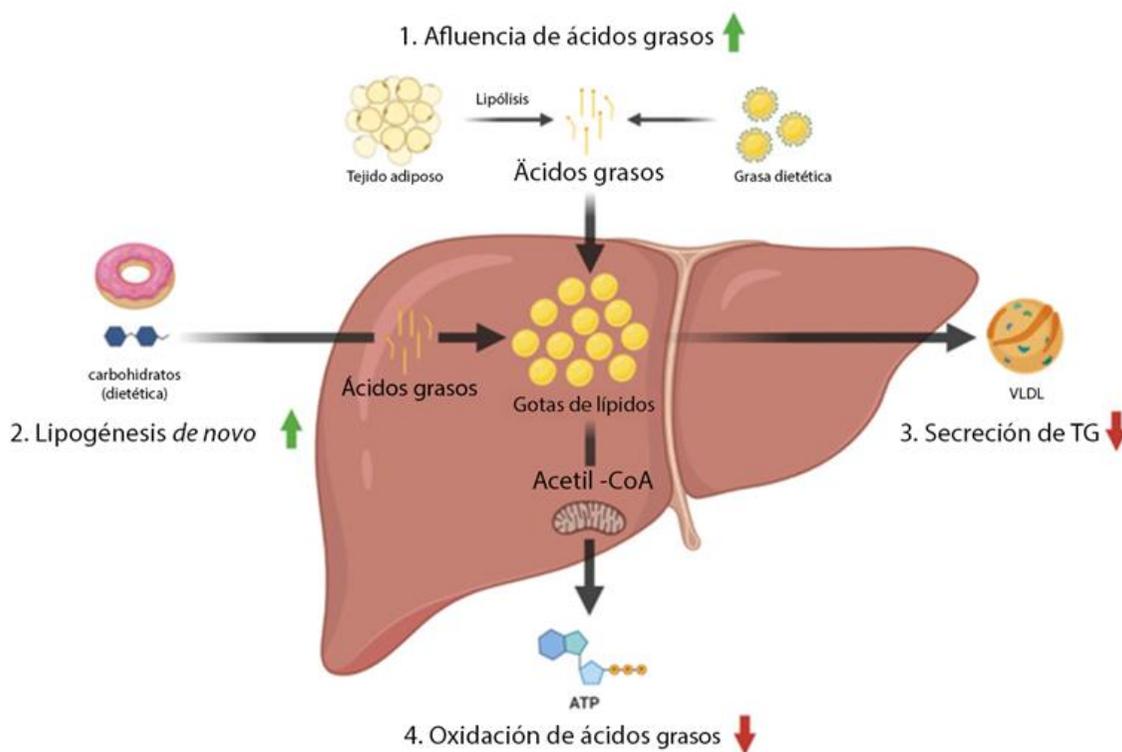
Varios estudios han demostrado que la misma NAFLD puede aumentar el riesgo de cardiopatía. Por esa razón, una causa común de muerte en pacientes con NAFLD es la enfermedad cardiovascular (40%) (Sinn et al., 2017).

Por otra parte, en los últimos años el número total de pacientes con enfermedad hepática terminal causada por NAFLD está aumentando vertiginosamente.

### 1.1.2 Esteatosis hepática

La esteatosis hepática es la acumulación de grasa en los hepatocitos, y es la característica tanto de NAFL como de NASH. La esteatosis ocurre cuando la incorporación o síntesis de grasa por los hepatocitos excede su exportación o degradación. Los lípidos más abundantes que se acumulan en los hepatocitos son los triglicéridos. El grado de acumulación de triglicéridos se utiliza para clasificar la gravedad de la esteatosis en la NAFLD; sin embargo, los triglicéridos, al no ser hepatotóxicos no pueden predecir la gravedad de la lesión hepática, la presencia de inflamación y fibrosis. Por otro lado, se acumulan otros lípidos, como, por ejemplo, ácidos grasos, diacilglicerol, oxisteroles, colesterol y fosfolípidos, que tienen actividad lipotóxica. Por lo tanto, la acumulación de estas moléculas altera la homeostasis metabólica de los hepatocitos y compromete la viabilidad.

La acumulación de grasa hepática es el resultado de un desequilibrio entre la adquisición y la eliminación de lípidos, que se regulan a través de cuatro vías principales: (1) captación de lípidos circulantes derivados de la dieta o del tejido adiposo, (2) síntesis de ácidos grasos hepáticos también conocida como lipogénesis “*de novo*”, (3) oxidación de ácidos grasos (FAO, *Fatty acid oxidation* en inglés) y (4) secreción de triglicéridos en forma de partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés *Very low density lipoprotein*) (Figura 3). Recientemente, también la lipofagia, una forma de autofagia específicamente involucrada en la degradación de los lípidos se ha identificado como una nueva vía relacionada con el metabolismo lipídico hepático en NAFLD (Grefhorst et al., 2020).



**Figura 3. Resumen de las principales vías que contribuyen a la acumulación de triglicéridos (TG) en NAFLD.** 1) absorción de ácidos grasos, 2) lipogénesis de novo, 3) secreción de TG y 4) oxidación de ácidos grasos. ATP, adenosina trifosfato; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad. (Modificado de Grefhorst et al., 2020).

Por lo tanto, los individuos con esteatosis hepática deben ser cuidadosamente evaluados para identificar los factores que podrían aumentar su susceptibilidad a la lipotoxicidad, de cara a identificar a las personas con esteatosis simple (NAFL) que están en mayor riesgo de desarrollar lesiones hepáticas relacionadas con los lípidos (NASH) (Manchado et al., 2016).

### 1.1.3 Esteatohepatitis no alcohólica

Las características histológicas de la esteatohepatitis no alcohólica incluyen esteatosis macrovesicular, degeneración en globo de hepatocitos (balonización), inflamación dispersa

## **Introducción**

(principalmente lobular) y puede incluir también fibrosis. (Brown et al.,2016). Mientras que la esteatosis simple (NAFL) se ha considerado generalmente una condición benigna, la esteatohepatitis no alcohólica es una enfermedad progresiva que puede derivar en cirrosis hepática y en carcinoma hepatocelular (Kleiner y Makhlof, 2016). Los cambios inflamatorios en la esteatohepatitis son inespecíficos y variables, pero suelen ser leves. Grupos de células mononucleares incluyendo células T y macrófagos se infiltran en las placas de hepatocitos. Debido a la complejidad y variabilidad de la enfermedad, se diseñaron diferentes sistemas de puntuación para evaluar la gravedad de la NASH. Existen tres sistemas de puntuación que se utilizan actualmente: el sistema Brunt, el sistema NASH CRN (del inglés, *Central Research Network*) y el sistema SAF (del inglés, *Steatosis, Activity and Fibrosis*). El sistema NASH CRN fue desarrollado específicamente como un método detallado para el seguimiento del cambio histológico. En principio, este sistema de puntuación se compone de NAFLD *Activity Score* (NAS), grado de fibrosis e identificación de NASH por reconocimiento de patrones. El NAS puede variar de 0 a 8 y se calcula por la suma de las puntuaciones de esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3) y balonización (0-2). En los pacientes con NASH, una puntuación de NAS mayor o igual a 5 se correlacionó fuertemente con un diagnóstico de “NASH definido”, mientras que un NAS menor o igual a 3 se correlacionó con un diagnóstico de “no NASH” (Juluri et al.,2011). El sistema SAF es el más reciente y aún no se ha utilizado ampliamente en ensayos clínicos. En este sistema, la esteatosis (S), la actividad (A) y la fibrosis (F) se evalúan por separado. La actividad se define como la suma de las puntuaciones de inflamación lobular y globos y varía de 0 a 4. (Kleiner y Makhlof, 2016)

### **1.1.4 Fibrogénesis hepática y progresión a cirrosis**

La fibrogénesis hepática se define como un proceso fisiológico de reparación tisular ante un daño hepático, en el cual participan tipos celulares diferentes y citocinas profibrogénicas (Torre et al.,2021). Durante un daño hepático agudo, los hepatocitos se regeneran y sustituyen el tejido necrótico. El daño estimula la activación de las células hepáticas estrelladas que producen grandes cantidades de proteínas de la matriz extracelular, que se depositan en el parénquima hepático y reclutan células inflamatorias. Entre estas proteínas,

la más abundante es el colágeno no fibrilar, que desempeña un papel importante en el proceso de regeneración y mantenimiento de la arquitectura hepática (Odena y Ramon, 2012). En un hígado sano la matriz extracelular está constituida por colágeno no fibrilar, de tipo IV y VI, y pequeñas cantidades de colágeno de tipos I y III.

Sin embargo, cuando las enfermedades hepáticas, independientemente de la etiología, producen un proceso inflamatorio y de reparación prolongado, causan un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular. Este proceso conduce a una incapacidad de regeneración de los hepatocitos y un exceso de matriz extracelular constituida por colágeno tipo III, pequeñas cantidades de colágeno tipo I, fibronectina, y diversos glucosaminoglicanos, dando lugar a la fibrosis hepática (Burt et al. 2018b). En fases avanzadas, las bandas de colágeno son más evidentes y se detecta una fibrosis en puente, que comporta la formación de septos fibrosos entre los espacios porta. Este proceso precede a la formación de nódulos hepáticos y, por tanto, el desarrollo de cirrosis (Odena y Ramon, 2012).

La progresión de la fibrosis hepática está influenciada por factores ambientales y genéticos. En pacientes con hígado graso, se ha demostrado que el factor genético más relevante es el polimorfismo en el gen de la adiponutrina (PNPLA3). A los factores genéticos se asocian, también, factores ambientales como el consumo de alcohol, el tabaquismo, una dieta alta en calorías, que pueden inducir y empeorar la respuesta pirogénica (Odena y Ramon, 2012).

Las diferentes etapas de la fibrosis y la gravedad se clasifican en cuatro estadios, según valores de cortes preestablecidos:

- **F0:** no hay fibrosis hepática, ninguna cicatrización.
- **F1:** fibrosis mínima dentro del área del hígado.
- **F2:** fibrosis significativa, ha ocurrido cicatrización y se extiende fuera del área del hígado.
- **F3:** la fibrosis grave, se propaga y forma puentes con otras áreas hepáticas
- **F4:** cirrosis o cicatrización avanzada.

## Introducción

### 1.1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad del hígado graso no alcohólico consiste en la identificación de esteatosis en ausencia de una causa secundaria, seguido de estratificación del riesgo por la presencia de inflamación y fibrosis significativa. Generalmente la primera señal de alarma son los niveles elevados de transaminasas hepáticas en la sangre, es decir, alanina aminotransferasa (ALT) y/o aspartato aminotransferasa (AST). Teniendo en cuenta los valores séricos de AST y ALT, el recuento de plaquetas y la edad se puede calcular la puntuación FIB-4 para valorar el grado de riesgo de progresión de la enfermedad. El paciente se clasifica con alto riesgo si el valor de FIB-4 es mayor de 2,67. Sin embargo, un gran número de personas puede presentar índices hepáticos normales a pesar de formas avanzadas de hepatopatía, por ejemplo, en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 o síndrome metabólico.

La ecografía representa, en la práctica clínica, un examen de fácil ejecución, bajo coste y no invasivo para el estudio de enfermedades hepáticas y del aparato biliar. Otra técnica no invasiva y fácilmente aplicable es la elastografía transitoria (*Fibroscan*), que utiliza ondas de ultrasonido para cuantificar la grasa hepática. Gracias a esta técnica se pueden diferenciar, de manera no invasiva, los diferentes grados de esteatosis controlando el cálculo del parámetro CAP (*Controlled Attenuation Parameter*), es decir, el grado de atenuación acústica tras el paso de los ultrasonidos en el tejido.

La utilización de estas técnicas no invasivas sigue presentando algunas limitaciones en el diagnóstico de la fibrosis. Por lo tanto, no existe una prueba no invasiva validada para el diagnóstico de la NASH, ya que la biopsia hepática sigue siendo la herramienta más fiable. La biopsia permite detectar las principales características que diferencian la esteatosis simple de la inflamación, representadas por la presencia de infiltrado inflamatorio y células baloniformes y por el grado de fibrosis. (Maurice y Manousou, 2018).

### 1.1.6 Gestión y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico

La Asociación Americana de Práctica Clínica de Endocrinología Clínica (AACE), en colaboración con la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades del Hígado (AASLD) ha publicado recientemente las directrices para el diagnóstico, la gestión y el tratamiento de la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD).

A pesar de que ningún medicamento ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la NAFLD, la gestión de esta enfermedad puede incluir:

- Cambios en el estilo de vida para promover la reducción del peso corporal, es decir, la pérdida de peso con una dieta baja en calorías, y restricción de grasas saturadas y ejercicio físico.
- Uso de medicamentos eficaces para la pérdida de peso, en particular agonistas de GLP-1 (*glucacon-like peptide 1*).
- Uso medicamentos antidiabéticos, como la pioglitazona en personas con diabetes mellitus tipo 2 y NASH.
- Recurrir a la cirugía bariátrica para los casos de obesidad grave.
- Reducir el aumento del riesgo cardiovascular asociado con NAFLD, promoviendo la salud cardiometabólica.

## 2 Deterioro cognitivo en enfermedades hepáticas

### 2.1 Encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática (EH) se define como una disfunción cerebral causada por insuficiencia hepática y/o hipertensión portal, que se manifiesta como un amplio espectro de anomalías neurológicas o psiquiátricas que van desde alteraciones subclínicas hasta coma. Sin embargo, otros factores etiológicos que conducen a enfermedades hepáticas crónicas,

## Introducción

como el alcohol, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, hepatitis viral y colangitis biliar primaria, pueden afectar al cerebro a través de mecanismos independientes de los desencadenados por la insuficiencia hepática/ hipertensión portal (Rose et al.,2020).

Desde el punto de vista epidemiológico, la EH es la complicación más frecuente de la cirrosis que puede conducir a hospitalizaciones y reingresos repetidos (Hirode et al.,2019). Se estima que el 10-14% de los pacientes al momento del diagnóstico de la cirrosis tienen EH, y a los 5, años el 25% pueden tenerla (Rose et al., 2020).

La encefalopatía hepática se clasifica en tres tipos de acuerdo con las diferentes etiologías (Ferenci et al.,2002):

- **Tipo A:** se produce en curso de insuficiencia hepática aguda.
- **Tipo B:** puede presentarse después de una intervención quirúrgica para insertar shunt portosistémico.
- **Tipo C:** proviene de una cirrosis hepática crónica. Las causas desencadenantes pueden ser diversas: infecciones, hemorragias gastrointestinales, sobredosis de diuréticos, hipovolemias, hiponatremias, fármacos psicotrópicos (por ejemplo, las benzodiazepinas), cargas proteicas.

La evaluación de la gravedad de la encefalopatía se basa en los criterios de West Haven (WHC) que establecen una clasificación del estado mental, con un puntaje que varía desde el grado 0, sin anomalías, que se denomina Encefalopatía Hepática Mínima (EHM), hasta el grado 4, en un estado de coma (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación WHC y ISHEN.**

Grados de WHC	ISHEN	Manifestaciones clínicas
Sin deterioro		No hay EH presente ni anterior
Mínima	Encubierta	Alteraciones de pruebas psicométricas o neuropsicológicas sin manifestaciones clínicas
Grado 1		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Falta de conciencia</li> <li>▪ Euforia o ansiedad</li> <li>▪ Capacidad de atención reducida</li> <li>▪ Alteración de la suma o resta</li> <li>▪ Ritmo de sueño alterado</li> </ul>
Grado 2		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Letargo o apatía</li> <li>▪ Desorientación en el tiempo</li> <li>▪ Cambios obvios de personalidad</li> <li>▪ Comportamiento inapropiado</li> <li>▪ Dispraxia</li> <li>▪ Asterixis</li> </ul>
Grado 3	Manifiesta	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Somnolencia a semi estupor</li> <li>▪ Respuesta a los estímulos</li> <li>▪ Confusión</li> <li>▪ Desorientación grave</li> <li>▪ Comportamiento extraño</li> </ul>
Grado 4		Coma

Modificada según *Vilstrup et al. (2014)*. EH, encefalopatía hepática; ISHEN, Sociedad Internacional para la Encefalopatía Hepática y el Metabolismo del Nitrógeno; WHC, criterios de West Haven.

Recientemente la Sociedad Internacional para la Encefalopatía Hepática y el Metabolismo del Nitrógeno (ISHEN) ha establecido criterios para la clasificación de la encefalopatía hepática basándose en la clasificación de West Haven (Tabla 1). El consenso de ISHEN clasifica la EH en:

- **EH manifiesta** (*overt hepatic encephalopathy (OHE)*): grado de West Haven 2-4, diagnóstico basado en síntomas clínicos que van desde desorientación al coma.
- **EH encubierta** (*covert hepatic encephalopathy (CHE)*): engloba la encefalopatía hepática mínima (EHM) y grado 1 de West Haven, diagnóstico que requiere pruebas neuropsicológicas específicas.

## Introducción

### 2.1.1 Factores implicados en el desarrollo de la encefalopatía hepática

El deterioro neurológico y cognitivo provocado por la disfunción hepática son el resultado de diferentes factores derivados de la sangre que influyen en la permeabilidad y/o alteran la integridad de la barrera hematoencefálica, y que pueden actuar de forma sinérgica causando efectos nocivos en el cerebro.

#### ➤ **Hiperamonemia**

Una concentración elevada de amonio tiene efectos nocivos en la función del sistema nervioso central (SNC) (Felipo y Butterworth, 2002). Se sabe que la encefalopatía hepática se asocia con niveles elevados de amonio en la sangre y en el cerebro, aunque no se ha confirmado una correlación directa entre el grado de hiperamonemia y la gravedad de la EH.

El amonio es una molécula con muchas propiedades. Dependiendo del pH, es un ion ( $\text{NH}_4^+$ ) que se transporta a través de acuaporinas, transportadores de amonio, canales  $\text{K}^+$  y cotransportadores, o un gas ( $\text{NH}_3$ ) que se difunde libremente a través de las membranas plasmáticas. En solución acuosa el amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) está en equilibrio con el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La relación  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  en función del pH está definida por la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\log_{10}[\text{NH}_3/\text{NH}_4^+] = \text{pH} - \text{pKa}$$

En condiciones fisiológicas, el pKa de  $\text{NH}_3$  es 9.15, por lo tanto, a pH fisiológico la reacción favorece la formación de  $\text{NH}_4^+$  (Felipo y Butterworth, 2002).

El amonio se produce principalmente en el intestino, como producto final de la digestión de proteínas, la desaminación de aminoácidos y la actividad de la ureasa bacteriana. Posteriormente el amonio se detoxifica en el hígado a través del ciclo de la urea, y su concentración en la sangre se regula y se mantiene en un rango bajo, de 35-50  $\mu\text{M}$  (Rose et al., 2020). Cuando ocurre un daño hepático, la detoxificación del amonio no se lleva a cabo adecuadamente, causando un aumento de sus niveles en sangre y cerebro. Sin embargo, el

amonio es un sustrato importante para varias reacciones enzimáticas y es un producto de otras reacciones (Felipo y Butterworth, 2002). En el cerebro, los astrocitos metabolizan el amonio mediante la enzima glutamina sintetasa, convirtiendo el glutamato y el amoniaco en glutamina. Las neuronas captan la glutamina y la transforman en glutamato para ser liberado como neurotransmisor excitatorio que activa los receptores N-metil D-aspartato. Posterior a su liberación sináptica, el glutamato es reciclado por los astrocitos a glutamina. Cuando los niveles de amonio aumentan de forma aguda en el cerebro, la comunicación de los astrocitos y de las neuronas se afecta. Los astrocitos metabolizan el amonio a glutamina, causando una acumulación de glutamina, y por tanto un aumento de la osmolaridad intracelular que promueve la hinchazón de los astrocitos, en consecuencia, edema cerebral y muerte de estas células (Romero-Gómez, 2005; Felipo, 2013).

### ➤ **Inflamación**

Estudios previos demostraron la existencia de una correlación entre los niveles séricos de algunas citocinas proinflamatorias y la gravedad de la EH. En el 2004, un estudio de Odeh et al. (Odeh et al., 2004) con pacientes con insuficiencia hepática crónica, reveló una correlación entre los niveles séricos de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) y la severidad de la EH. Los pacientes con EH de grado 4 mostraron una concentración sérica de TNF- $\alpha$  más alta respecto a los pacientes con EH de grados inferiores. Además, los niveles en suero de las citocinas proinflamatorias, interleucina 6 (IL-6) e interleucina 18 (IL-18), se correlacionan con la gravedad de la EHM en pacientes con cirrosis (Montoliu et al., 2009). Shawcross et al., en un estudio con pacientes cirróticos con EH de grado 3 y 4, demostraron una correlación entre la inflamación y la gravedad de EH. La inflamación fue significativamente mayor en pacientes con EH de grado 4 respecto a los pacientes de grado 3. Sin embargo, no se encontró correlación entre los niveles de amoniaco y gravedad de la enfermedad hepática medida por la puntuación MELD (*Model for end-stage Liver Disease*) (Shawcross et al., 2011).

## Introducción

### ➤ **Sinergia entre inflamación periférica e hiperamonemia en la inducción del deterioro cognitivo**

La hiperamonemia es una característica y uno de los factores subyacentes al desarrollo de la EH en pacientes con insuficiencia hepática crónica, pero aún no se ha demostrado la existencia de una correlación directa entre los niveles elevados de amonio y la severidad de la EH. Sin embargo, como se explica en el apartado anterior, una mayor inflamación periférica se ha correlacionado con los diferentes grados de la EH. Esto ha sugerido la hipótesis de que la hiperamonemia y la inflamación no son dos mecanismos distintos, sino que podrían actuar sinérgicamente en la inducción de la EH. La relación sinérgica entre la hiperamonemia y la inflamación sistémica en el desarrollo de la EH ha sido ampliamente estudiada tanto en modelos animales como en humanos.

La inducción de hiperamonemia, por administración de una solución de aminoácidos, a pacientes cirróticos con inflamación debida a infección, dio lugar a un peor rendimiento en las pruebas psicométricas durante el estadio inflamatorio y una mejora después del tratamiento de la infección (Shawcross et al., 2004). Este sinergismo se confirmó más tarde en modelos de ratas con ligadura de conducto biliar, mostrando que la inducción de la respuesta inflamatoria por administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS), resulta en hiperamonemia, edema cerebral y pre-coma (Wright et al., 2007). Además, en este modelo de ratas con ligadura de conducto biliar, las ratas alimentadas con amonio en comparación con aquellas con una dieta normal, a igual niveles de inflamación, presentaron concentración de glutamina cerebral y edema mayor (Jover et al., 2006).

Con el fin de evaluar el papel de la hiperamonemia y de la inflamación en el desarrollo del deterioro cognitivo, nuestro grupo llevó a cabo un estudio en pacientes con patologías diferentes que presentaban distintos grados de hiperamonemia e inflamación. Mediante pruebas psicométricas evaluaron la presencia de deterioro cognitivo en los distintos grupos y analizaron los niveles de amonio y de las citocinas proinflamatorias, IL-6 e IL-18. Comprobaron que la hiperamonemia o la inflamación solas no inducen deterioro cognitivo, pero la combinación de elevados niveles de amonio e inflamación es suficiente para inducir el deterioro cognitivo, no solo en enfermedades hepáticas, sino también en otras patologías inflamatorias. (Felipo, et al., 2012a).

### ➤ Neuroinflamación

Otros factores importantes implicados en el desarrollo de la EH es la neuroinflamación. El hígado inflamado, junto con la translocación bacteriana intestinal y la infección, agrava la inflamación sistémica, que a su vez produce disfunción de la barrera hematoencefálica e neuroinflamación. Los cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) pueden causar la infiltración en el cerebro de células inmunes que secretan factores proinflamatorios que pueden activar y dañar las células del cerebro (Felipo et al.,2013). Una consecuencia evidente de la existencia de la neuroinflamación en la insuficiencia hepática consiste en la activación de las microglías. Las células de la microglía son los macrófagos residentes del cerebro, y tras un daño vascular o tisular cerebral, se activan y, a su vez, liberan una amplia gama de citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias, que juegan un papel crucial en la neurodegeneración (Garden y Möller, 2006). Se demostró un aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) en el cerebro de pacientes con insuficiencia hepática aguda e hipertensión intracraneal incontrolada, a pesar del tratamiento médico estándar, confirmando la cascada inflamatoria en el cerebro Este flujo de citocinas cerebrales puede ser una respuesta a una cascada inflamatoria sistémica activada, que luego, mediante la secreción de ciertas citocinas, modula la respuesta inflamatoria cerebral. (Wright et al.,2007).

Una prueba importante de la neuroinflamación fue proporcionada por estudios de Jiang et al. que demostraron un aumento de la expresión de genes codificantes para citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y IL-6) en rata con fallo hepático agudo. El aumento de la expresión se correlacionó con la progresión de la encefalopatía y la aparición de edema cerebral. En este estudio se observaron aumentos en la expresión de CD11b/c (OX-42), característica de la activación microglial (Jiang et al, 2009). Además, la activación microglial se ha identificado en muestras de tejido cerebral de pacientes con cirrosis fallecidos por coma hepático (Butterworth, 2011).

El papel de la neuroinflamación en la EH aguda fue establecido por un estudio de Chung et al.,2001, demostrando que el tratamiento con un antiinflamatorio, la indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2, era capaz de proteger a ratas con anastomosis portacaval y amonio inyectado, contra el desarrollo de edema cerebral. Posteriormente, Jiang et al.,

## Introducción

demonstraron que el tratamiento con la minociclina, un antibiótico de la clase de las tetraciclinas actuaba en el cerebro previniendo la formación de edema en ratas con fallo hepático (Jiang et al., 2009).

Compatible con el papel de la inflamación en el cerebro en la formación de edema asociado a un daño hepático, Rama Rao et al., demostraron que el tratamiento de los astrocitos cultivados con citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ ) causaba hinchazón de los astrocitos. El efecto era mayor cuando los cultivos de astrocitos se trataban durante 24 horas con la combinación de citocinas, después de 24 horas de incubación con amonio (Rama Rao et al. 2010).

Además, evidencias recientes sugieren que el deterioro cognitivo y la neuroinflamación causada por la hiperamonemia crónica, inducida experimentalmente, podría ser mediada por la inducción de la inflamación sistémica que es reversible mediante la reducción de amonio sistémico, o por tratamiento antiinflamatorio (Balzano et al., 2020).

## 2.2 Deterioro cognitivo leve en NAFLD

En los últimos años, se está reconociendo que el deterioro cognitivo leve puede ser una posible complicación asociada con la NAFLD.

El deterioro cognitivo leve (DCL), conocido también como MCI, en sus siglas en inglés por *Mild Cognitive Impairment*, se define como un deterioro en la cognición que no se justifica por la edad, sino que es consecuencia de alguna condición médica. Este trastorno puede afectar a varias funciones cognitivas, como pueden ser la memoria, el lenguaje, función visuoespacial, la atención o la concentración (Colognesi et al., 2020). Sin embargo, estas alteraciones no son lo suficientemente graves como para cumplir los criterios para el diagnóstico de demencia (Sanford, 2017).

Varios estudios han evaluado las posibles alteraciones cognitivas en pacientes con NAFLD, pero todavía no está bien definida la metodología para caracterizar y detectar el deterioro cognitivo en estos pacientes. Un estudio reciente de Seo et al., detectó alteraciones en la

atención y memoria en sujetos con NAFLD (Seo et al, 2016). Weinstein et al. mostraron que los pacientes con NAFLD de alto riesgo de fibrosis tenía dificultades con el razonamiento abstracto y velocidad de procesamiento (Weinstein et al, 2019). Los estudios de Celikbilek y Tuttolomondo encontraron déficits en las funciones ejecutivas y visuo-espacial utilizando las baterías de pruebas MoCA y MMSE (Celikbilek et al.,2018; Tuttolomondo et l., 2018).

Solo algunos estudios han investigado el impacto de la gravedad de la NAFLD, y por tanto de la inflamación, en la función cognitiva. Un estudio de nuestro grupo, utilizando la batería de test PHES, demostró que los pacientes con esteatosis simple no presentaban deterioro cognitivo, mientras que los pacientes con NASH y con niveles altos de amonio y de parámetros inflamatorios en la sangre, mostraban un rendimiento empeorado en todos los test evaluados. Esto sugiere que, a mayor gravedad de la enfermedad, en consecuencia, mayor inflamación e hiperamonemia, se asocia a un mayor riesgo de deterioro cognitivo en NAFLD.

### **2.2.1 Posibles mecanismos implicados en la inducción del deterioro cognitivo en NAFLD**

NAFLD es una enfermedad multisistémica y con distintas características clínicas que pueden ser la causa de los trastornos cognitivos mencionados. Por lo tanto, factores como la disfunción hepática, disfunción vascular, apnea del sueño y diabetes pueden, de manera distintas, influenciar en la disfunción cognitiva en el mismo individuo (Kjærgaard et al., 2021). A continuación, se describen los posibles mecanismos que contribuyen a la disfunción cognitiva en NAFLD, agrupados en 5 bloques: inflamación periférica y neuroinflamación, disfunción del metabolismo hepático y amonio, alteraciones en la microbiota intestinal, arteriosclerosis y disfunción cerebrovascular, y neurodegeneración (Figura 4).

## Introducción

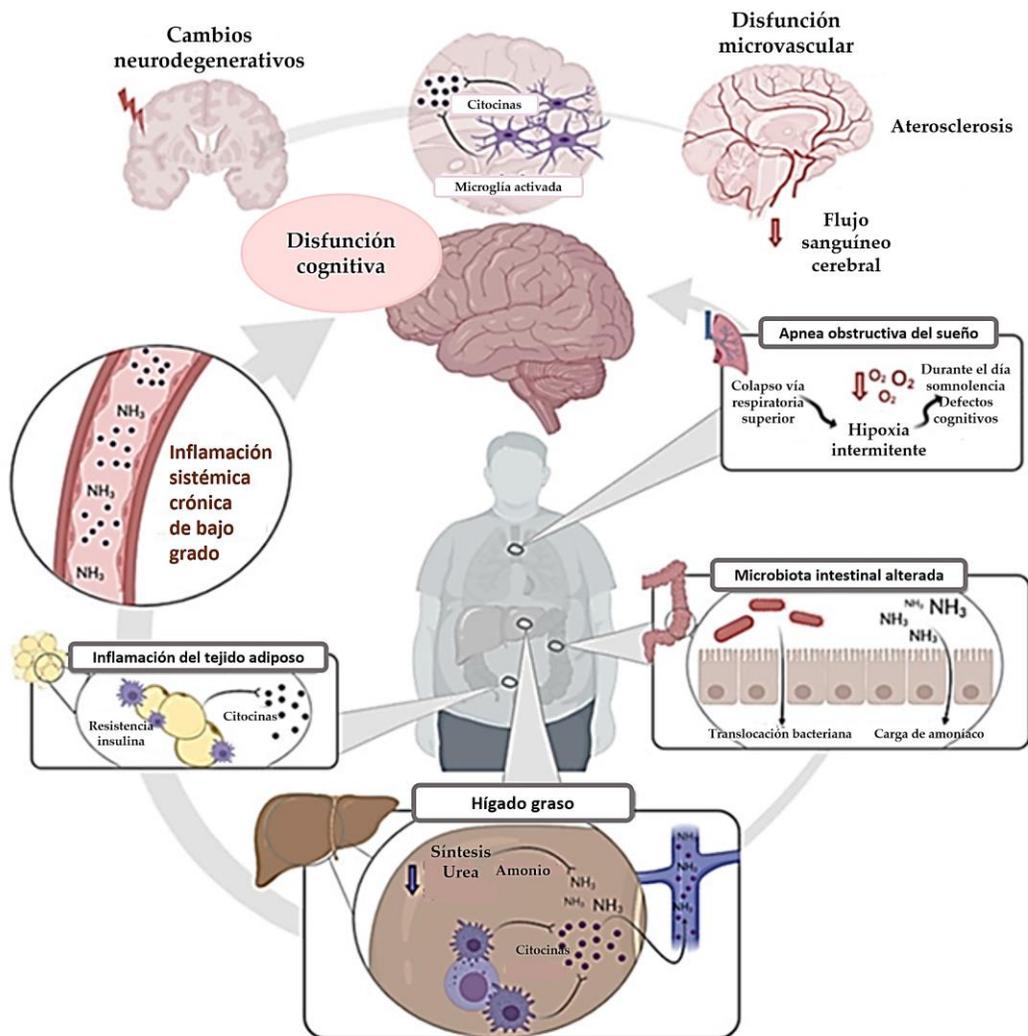


Figura 4. Posibles factores implicados en la inducción del deterioro cognitivo en NAFLD. (Modificado de Kjærgaard et al., 2021)

### ➤ Inflamación periférica y neuroinflamación

La inflamación es una característica clave en el desarrollo de la NAFLD, en particular de la NASH. La acumulación de lípidos en el hígado y la lesión de los hepatocitos estimulan la secreción de quimiocinas para inducir el reclutamiento de macrófagos en el hígado, y por tanto la producción de distintas citocinas proinflamatorias (Fricker et al., 2019).

Del tejido adiposo y hepático, la inflamación puede extenderse y afectar otros órganos, incluyendo el cerebro. Sobre esta base, se ha propuesto que la inflamación sistémica podría ser un factor importante en el desarrollo del deterioro cognitivo en NAFLD y el síndrome metabólico, pero aún no está claro como la inflamación se propaga al cerebro (Miller y Spencer, 2014; Viscogliosi et al., 2013).

Recientes estudios han demostrado la presencia de disfunción cognitiva y neuroinflamación en modelos animales de NASH. Veniaminova et al, demostraron que, en ratones no obesos, la ingesta anormal de alimentos altamente calóricos se asocia con cambios en la expresión génica de la corteza prefrontal, que está involucrada en el control del comportamiento inhibitorio, y disfunción en la coordinación motora (Veniaminova et al., 2020).

En modelos animales han demostrado que el consumo crónico de dieta FPC (fructosa, palmitato y colesterol) afecta negativamente a la salud del hígado y la cognición. La microbiota intestinal alterada, y sus metabolitos, incluidos los ácidos biliares, afectan a la señalización de la citocina proinflamatoria IL-17A, causando alteraciones de las funciones cognitivas (Jena et. Al, 2020).

Asimismo, Kim et al. demostraron que la NAFLD acelera los síntomas de la enfermedad de Alzheimer en el sistema nervioso central (SNC) al inducir apoptosis neuronal y disminuir la expresión del receptor de lipoproteínas 1 (LRP1), responsable de la depuración de la placa  $\beta$ -amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Kim et al., 2016).

En un estudio de nuestro grupo demostramos la presencia de neuroinflamación en cerebelo post-mortem de pacientes con NAFLD, con activación de la microglía y astrocitos en meninges del cerebelo, asociados a una pérdida de neuronas granulares y de Purkinje y infiltración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> como, Th17, Tfhf y CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (Balzano et al., 2018).

### ➤ **Disfunción del metabolismo hepático y amonio**

Como se ha descrito anteriormente, la acumulación sistémica del amonio en los pacientes cirróticos es consecuencia de la inhibición, por el daño hepático, de la detoxificación del amonio a través del ciclo de la urea. Evidencias recientes muestran que, también en

## Introducción

NAFLD, ya en la primera etapa de esteatosis simple, ocurre una disfunción del metabolismo hepático para la síntesis de la urea y reducción de la expresión de las enzimas del ciclo de la urea, causando hiperamonemia (Lykke et al., 2019; Thomsen et al., 2014; De Chiara et al., 2018; Eriksen et al., 2019).

El papel de la hiperamonemia y de su acción sinérgica con la inflamación en el desarrollo de la EH en paciente cirróticos se ha argumentado ampliamente en el apartado anterior. Sin embargo, en NAFLD, poco se sabe sobre la interacción entre el amonio y la disfunción cognitiva. Además del estudio de nuestro grupo, donde se evidencia el papel crucial de la hiperamonemia y de la inflamación en el desarrollo de las alteraciones cognitivas en pacientes con NASH (Felipo et al. 2012), otro estudio, en ratas con NASH inducida por la dieta, confirmó disfunciones cognitivas asociadas a hiperamonemia sistémica y concentraciones alteradas de neurotransmisores en varias regiones del cerebro (Higarza et al., 2019).

### ➤ Alteraciones en microbiota intestinal

La microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la interconexión entre intestino y cerebro, y se ha denominado a este sistema “eje microbiota-intestino-cerebro”. La disfunción del eje microbiota-intestino-cerebro se asocia con EH en pacientes cirróticos, y esta asociación se pone de manifiesto por los efectos beneficiosos en las alteraciones cognitivas tras el trasplante de microbiota fecal, tratamiento con laxantes, lactulosa o rifaximina (Bajaj, 2014; Bajaj et al., 2015; Vilstrup et al., 2014).

Este conocimiento sugirió el interés de la evaluación del papel de microbiota intestinal en NAFLD. En la enfermedad del hígado graso no alcohólico, el aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal debida a disbiosis resulta en la translocación de bacterias y endotoxinas al hígado a través de la vena porta, desencadenando una cascada de inflamación hepática, lipogénesis, estrés oxidativo, resistencia a la insulina y fibrogénesis (Ilan, 2012; Raman et al., 2013; Zhu et al., 2013).

Algunos estudios muestran una disminución de la carga de *Bacteroidetes* tanto en ratones obesos modificados genéticamente como en pacientes obesos con NASH, respecto al grupo control y a los pacientes obesos sin NASH (Ley et al., 2005; Mehal, 2013).

Estudios sugieren que los pacientes con NAFLD presentan disfunción cognitiva que se correlaciona con una alteración de microbiota intestinal, pero aún no se ha demostrado esta relación. Sin embargo, en ratas con NASH, además de la hiperamonemia, la disfunción neuroconductual estaba asociada a una disbiosis intestinal y disminución de ácidos grasos microbianos de cadena corta (Higarza et al., 2019). En otro estudio, ratas con NASH inducida por dieta, presentaban una disminución en el aprendizaje espacial y la memoria respecto a las ratas controles. Tras el tratamiento con el probiótico “*Lactobacillus plantarum*” durante 2 semanas, las alteraciones cognitivas en las ratas con NASH se revertían, y además, observaron una mejoría en la esteatosis, hinchazón y fibrosis. Aunque no se han analizado los cambios taxonómicos en las heces, los efectos del tratamiento con probióticos han sido inducidos por un cambio beneficioso en el microbiota intestinal. (Mohammed et al., 2020).

### ➤ **Arteriosclerosis y disfunción cerebrovascular**

La enfermedad del hígado graso no alcohólica está estrechamente relacionada con las complicaciones vasculares, y más del 64% de los eventos cardiovasculares mortales o no mortales, como el infarto de miocardio, están asociados a la NAFLD (Targher et al., 2016).

Seguramente esta asociación se debe principalmente a los factores de riesgo metabólico relacionados a la NAFLD, incluidas la hipertensión, la obesidad, la resistencia a la insulina, todas asociadas también con la disfunción cerebrovascular (Fargion et al., 2014; de la Torre, 2012).

Sin embargo, NAFLD también actúa como factor de riesgo independiente, posiblemente debido a la inflamación hepática, que promueve una mayor expresión de factores proinflamatorios y procoagulantes aumentando el riesgo de arteriosclerosis (Fargion et al., 2014; Tripodi et al., 2014; Hansson, 2005).

Estudios que evalúan el impacto de la arteriosclerosis y disfunción cerebrovascular en el deterioro cognitivo en pacientes con NAFLD están confirmados. Tuttolomondo et al., investigaron la asociación entre la disfunción vascular y la disfunción cognitiva en la NAFLD afirmando que los pacientes con NAFLD con una mayor rigidez arterial y disfunción endotelial estaban asociados a una puntuación peor de las pruebas psicométricas

## **Introducción**

evaluadas. Además, encontraron unos niveles más altos de rigidez arterial en los pacientes con fibrosis en comparación con aquellos sin fibrosis hepática (Tuttolomondo et al., 2018). Tales alteraciones vasculares en NAFLD pueden llevar a una disminución del flujo sanguíneo cerebral, que también es importante para la función cognitiva (Wolters et al., 2017)

En particular, un estudio mostró que mujeres con NAFLD tenían una disminución de la actividad cerebral, específicamente una disminución de la concentración de hemoglobina oxigenada cerebral, que reflejaba una disminución de la actividad cerebral registrada por un menor número de palabras articuladas en la prueba fluencia verbal (Takahashi et al., 2017).

Por lo tanto, las evidencias actuales sugieren fuertemente que NAFLD se asocia independientemente con disfunción vascular, lo que resulta en una crónica disfunción cerebrovascular y alteración del flujo sanguíneo cerebral que pueden inducir cambios neurodegenerativos permanentes del cerebro.

### **➤ Neurodegeneración**

Aunque el síndrome metabólico y sus componentes de diabetes y obesidad se han reconocido como factores de riesgo importantes para la patogénesis de la neurodegeneración y el desarrollo de deterioro cognitivo leve y demencia (Ng et al., 2016; Atti et al., 2019; Cheng et al., 2012; Pedditzi et al., 2016), los estudios que investigan la asociación entre NAFLD y demencia son escasos.

Solfrizzi et al., en un estudio reciente sugirieron que la fibrosis hepática podría ser un potencial factor de riesgo de la incidencia de demencia en pacientes con NAFLD con fragilidad física (Solfrizzi et al., 2020).

Por el contrario, otro estudio no encontró ninguna asociación de la NAFLD con el diagnóstico de demencia durante un período de 10 años en pacientes de edad avanzada (Labenz et al., 2020). Según estimaciones de Weinstein et al., mediante estudios cerebrales con resonancia magnética, la NAFLD se asoció de forma independiente con una reducción del volumen cerebral total, correspondiente a 4,2 años de envejecimiento cerebral en comparación con los controles de misma edad (Weinstein et al., 2018).

Diferentes estudios apoyan la idea de que NAFLD, por las disfunciones metabólicas asociadas, también puede aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA). Karbalaie et al., en un estudio de metaanálisis mostró que NAFLD y EA comparten 189 genes, divididos en tres vías principales: metabolismo de carbohidratos, metabolismo de ácidos grasos de cadena larga y la vía de señalación de IL-17 (Karbalaie et al.,2018).

El papel de la NAFLD en la EA ha sido corroborado en modelos murinos de EA, donde la inducción de NAFLD aceleró notablemente los signos patológicos de la EA como la neuroinflamación, hipoperfusión cerebral, reducción de la expresión de cerebro LRP-1, y desregulación del metabolismo  $\beta$  amiloide (Kim et al., 2016; Pinçon et al., 2019).

Por lo tanto, podemos deducir que el daño hepático y la disfunción metabólica característicos de la NAFLD, podrían contribuir al desarrollo de neurodegeneración y, en consecuencia, aumentar un posible riesgo de demencia.

### **3 El sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria**

El sistema inmunitario es un conjunto de órganos, células, factores humorales y citocinas altamente especializadas, y es el encargado de proteger al organismo frente agentes externos o lesiones internas que pueden causar infecciones. En la defensa frente al patógeno o sustancia tóxica, el sistema inmunitario utiliza una serie de mecanismos de protección y control para evitar daños excesivos de los propios tejidos sin eliminar microbios comensales beneficiosos. La característica primordial de estos mecanismos se basa en el reconocimiento y discriminación de las características estructurales del patógeno o toxina que lo distinguen de las células huésped. La capacidad del sistema inmune para obviar el desencadenamiento de mecanismos destructivos contra los propios tejidos se conoce como auto-tolerancia. La tolerancia inmunitaria puede ser definida como la falta de respuesta a un antígeno, propio o externo, inducida por la exposición previa. (Chaplin,2010).

## Introducción

### 3.1 Respuesta inmune: innata y adaptativa

Para defender nuestro organismo de patógenos externos, el sistema inmunitario puede activar dos tipos diferentes de respuesta: la respuesta innata y la respuesta adaptativa. Ambas incluyen la discriminación de propio y no propio, actuando con diferente mecanismo de acción, duración de la respuesta y diferente especificidad contra los patógenos externos. El sistema inmunitario innato representa una respuesta rápida y no específica que puede dañar el tejido; mientras que el sistema inmunitario adaptativo muestra un alto grado de memoria y especificidad, pero no es inmediata y puede tardar varios días o semanas en desarrollarse (Parkin y Cohen, 2001; Tomar y De, 2014). Sin embargo, las respuestas innata y adaptativa se activan juntas, modulándose y estimulándose entre sí. Por lo tanto, la sinergia entre ellas es esencial para una respuesta inmunitaria totalmente eficaz (Chaplin, 2010) (Figura 5).

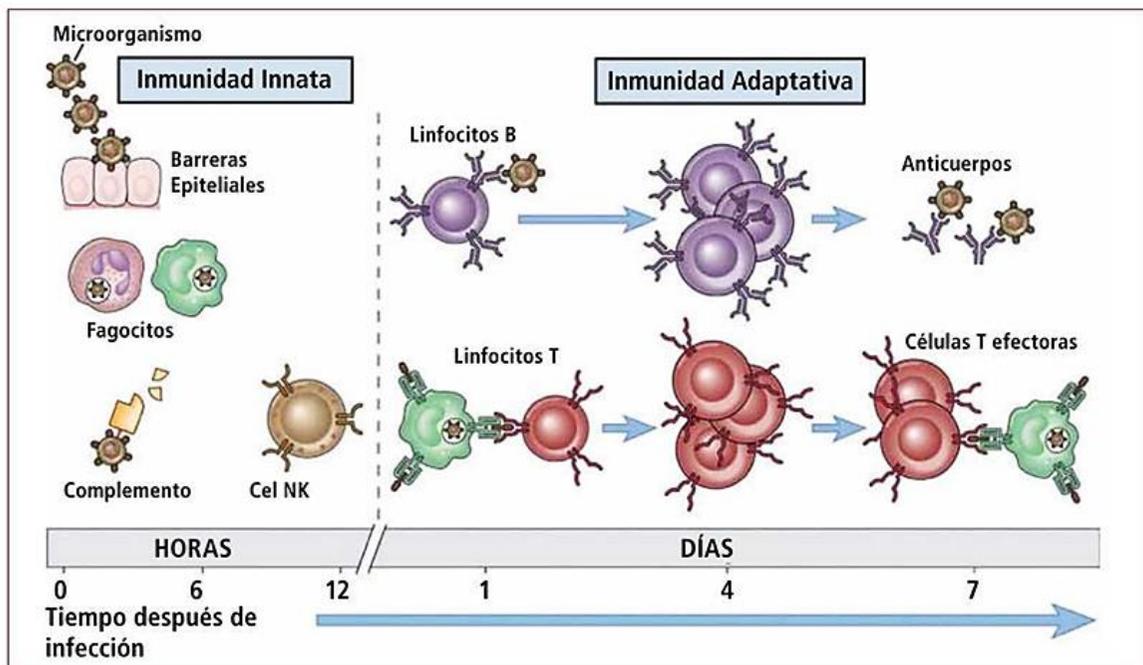


Figura 5. Sistema inmune innato y adaptativo. (Revista Médica Clínica Las Condes. 2012; 23:446-57)

La respuesta inmune innata consiste en barreras que proveen una defensa inmediata contra el patógeno, impidiendo su entrada en el organismo. Estas barreras forman la primera línea de defensa en la respuesta inmunitaria. Aunque no específico, el sistema innato es capaz de discriminar moléculas extrañas reconociendo pequeñas secuencias de moléculas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Parkin & Cohen, 2001). Estos patrones son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrón (*Pattern-recognition receptors* -PRRs), y los principales PRRs son los receptores tipo “toll” (*Toll-like Receptors* -TLRs) y los receptores tipo NOD (*NOD-like Receptors* -NLRs) (Akira et al., 2006).

Sin embargo, los más importantes son la familia de los receptores TLRs, capaces de reconocer una amplia variedad de agentes microbianos induciendo una respuesta inmune. Los receptores TLRs se encuentran ampliamente en diferentes células del sistema inmunitario y también en otras células como son los fibroblastos, células epiteliales y queratinocitos. En mamíferos se han descrito 11 tipos diferentes de receptores TLRs que se expresan mayormente en la superficie celular, pero también, en minoría, se pueden distribuir en compartimentos endosomales (Herrero, 2010).

Los TLRs que tienen un papel importante en el desarrollo de la NASH son:

- **TLR2:** reconoce un amplio rango de PAMPs, ya que puede expresar como homodímero o heterodímero por unión con TLR1 y TLR6.
- **TLR4:** es esencial para el reconocimiento del lipopolisacárido bacteriano (LPS), componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas. La relación de este receptor con la inflamación y fibrogenesis hepática se describe en el apartado 4.
- **TLR9:** es esencial para el reconocimiento de residuos no metilados CpG de ADN procedente de bacterias y virus.

El sistema inmune innato comprende cuatro tipos de barreras defensivas que evitan la entrada o la proliferación del patógeno: anatómicas (piel y membranas mucosas), fisiológicas (temperatura, pH bajo), inflamatorias (proteínas séricas), y fagocíticas (células fagocitarias) (Tomar & De, 2014).

## Introducción

Las células encargadas de la respuesta inmune innata son:

- **Monocitos/macrófagos**: Los monocitos son un tipo de leucocitos que se originan en la médula ósea y viajan a través del torrente sanguíneo a los tejidos de todo el cuerpo, donde maduran y se diferencian en macrófagos. Ambos presentan capacidad fagocítica y estimulan otras células del sistema inmunitario mediante la liberación de enzimas, proteínas y otros factores reguladores.
- **Granulocitos**: Los granulocitos deben su nombre a la presencia de gránulos en su citoplasma, también se conocen como células polimorfonucleares (PMN) debido a sus característicos núcleos lobulados. Los granulocitos se dividen a su vez en basófilos, neutrófilos y eosinófilos. Los neutrófilos son los más numerosos de los leucocitos circulantes en la sangre, y son capaces de realizar fagocitosis protegiendo al organismo de agentes extraños. Los basófilos y eosinófilos son importantes en la defensa contra los parásitos y desempeñan un papel importante en las reacciones alérgicas, como el asma.
- **Natural killer o NK**: Las células *Natural killer* tienen la morfología de los linfocitos, pero no tienen un receptor de antígeno específico. Estas células, en su superficie, tienen receptores para el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, MHC-I (*Major histocompatibility complex*). Células tumorales y virus a menudo causan una regulación a la baja del marcador de superficie celular MHC-I. Las células NK se activan y reconocen las células huésped comprometidas por los bajos niveles del marcador de superficie y causa su lisis por secreción de perforinas en la superficie de la célula huésped.
- **Mastocitos y plaquetas**: Los mastocitos y plaquetas son fundamentales en la inducción y el mantenimiento de la inflamación.

La **respuesta inmune adaptativa** consiste en una respuesta inmunitaria más compleja y se distingue de la respuesta innata por su especificidad y memoria.

Las células responsables de la respuesta adaptativa son los linfocitos B y T. Ambos se diferencian y maduran en la médula ósea, posteriormente emigran por el torrente sanguíneo alcanzando los órganos linfoides donde tiene lugar el reconocimiento con el antígeno

específico. Tras el reconocimiento las células vírgenes (*naïve*) proliferan, se activan y se convierten en células efectoras responsables de las respuestas inmunitarias o se mantienen como células de memoria (Chaplin,2010) (Figura 6).

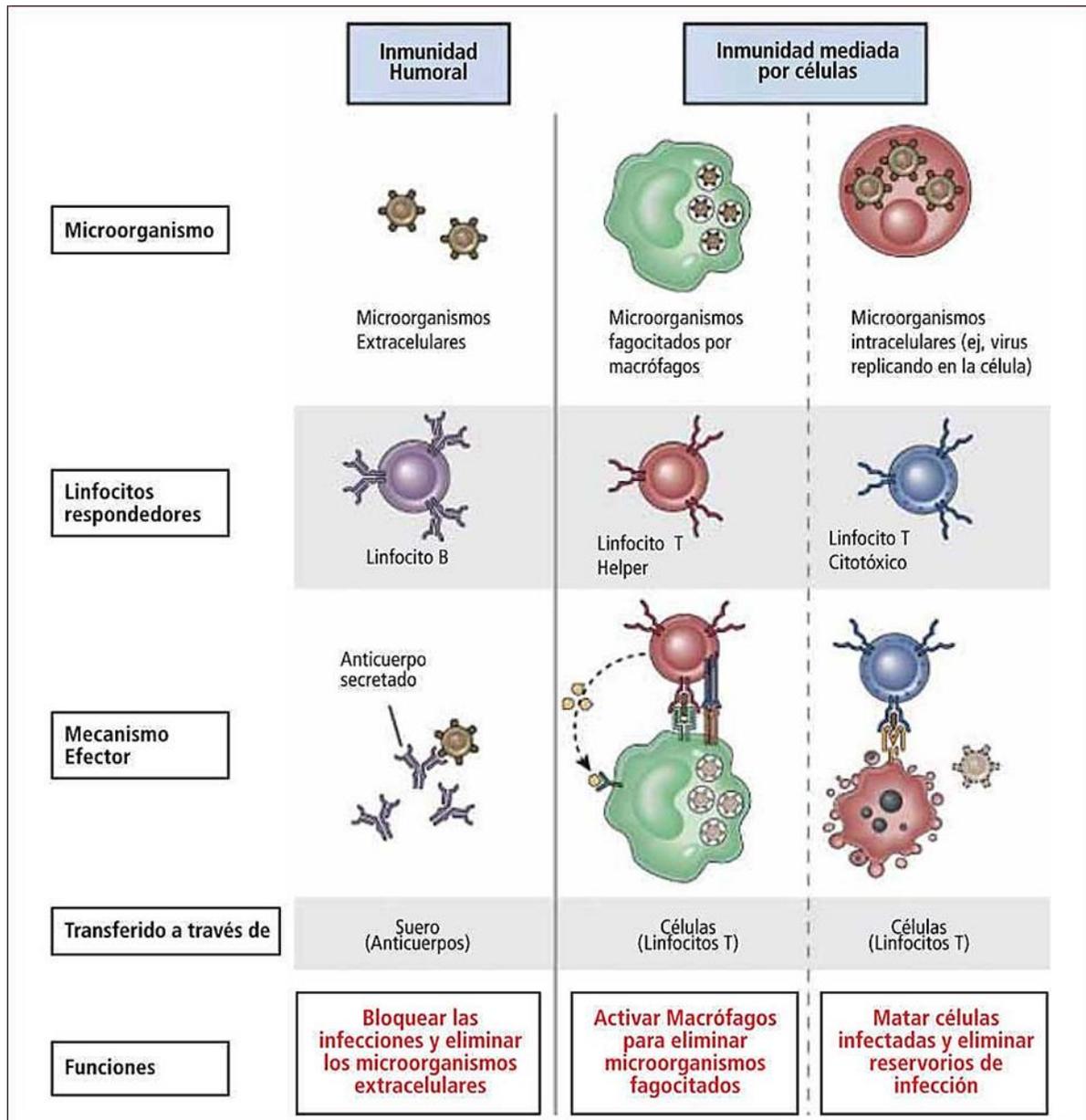


Figura 6. Sistema inmune adaptativo: respuesta humoral y adaptativa. (Revista Médica Clínica Las Condes. 2012; 23:446-57)

## Introducción

La respuesta inmunitaria se denomina respuesta humoral si está mediada por linfocitos B y anticuerpos, o respuesta celular si está mediada por linfocitos T. Estos dos tipos de respuesta no actúan de forma independiente, ya que los linfocitos B pueden proceder presentando el antígeno a los linfocitos T, mientras que los linfocitos T pueden ayudar a los linfocitos B a generar anticuerpos.

### 3.1.1 Respuesta humoral

La respuesta humoral empieza cuando un linfocito B *naïve* reconoce su antígeno específico en los tejidos y órganos linfoides secundarios. Los linfocitos B presenta un receptor de antígeno (BCR: Receptor de células B), una molécula de inmunoglobulina de superficie no secretable (IgM o IgD), que se une a dominios específicos del antígeno. Tras el reconocimiento, cada linfocito B madura y se activa, diferenciándose en una célula plasmática (o Célula Secretora de Anticuerpos, ASC) capaz de sintetizar y secretar inmunoglobulinas (anticuerpos), específicas para su epítipo.

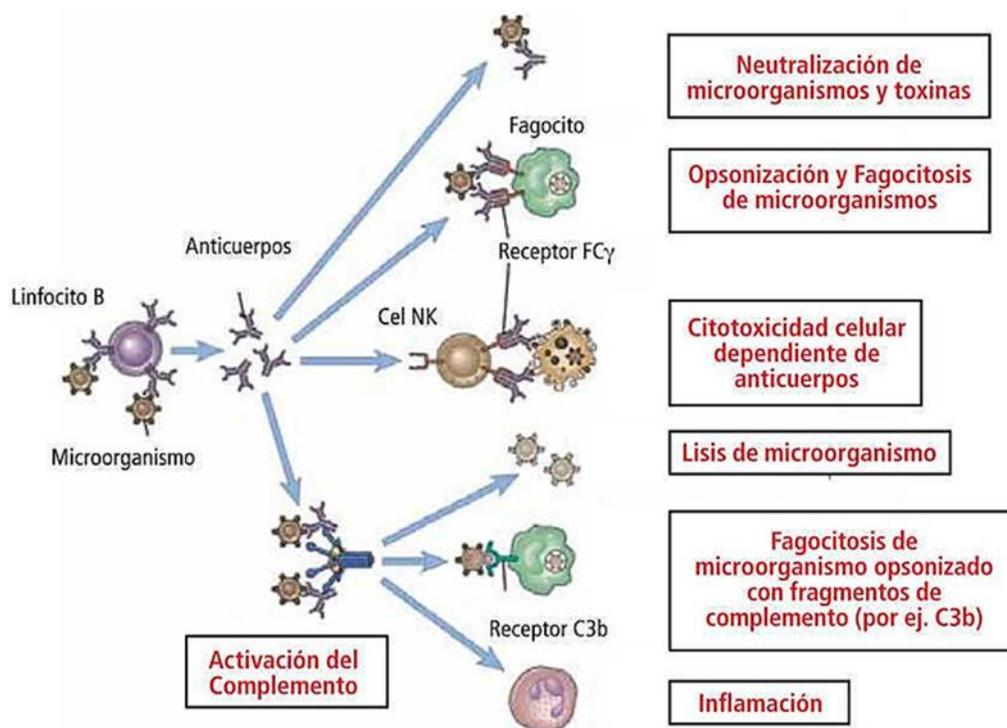
Los anticuerpos son proteínas plasmáticas globulares capaces de neutralizar las toxinas y obstaculizar la adhesión de los microorganismos a las mucosas, además favorecen la opsonización de las bacterias para la fagocitosis (Figura 7).

Según su actividad biológica los anticuerpos se dividen en las siguientes clases (Schroeder y Cavacini, 2010):

- **IgA:** recubre las mucosas infectadas por agentes patógenos externos, por tanto, se encuentra fundamentalmente en las secreciones (saliva, lágrimas, secreción intestinal, etc.).
- **IgD:** se encuentra en niveles muy bajos en el suero con una vida media sérica corta. Es una inmunoglobulina asociada a la membrana de los linfocitos B que las estimula y las activa. La mayoría de las células  $IgD^+$  B también co-expresan IgM y puede reemplazar IgM y viceversa en las células  $B\ IgD^+IgM^+$ .
- **IgE:** aunque está presente en la concentración sérica más baja con la vida media más corta, es una inmunoglobulina muy potente que participa en las reacciones de

hipersensibilidad, reacciones alérgicas, así como en la respuesta a las infecciones parasitarias.

- **IgG:** es la inmunoglobulina más abundante en el plasma, es monomérica y es producida en grandes cantidades. Sus principales funciones biológicas incluyen fijación del complemento, eliminación de patógenos opsonizados y, además, contribuyen directamente en la respuesta inmune neutralizando toxinas y virus.
- **IgM:** es la primera inmunoglobulina expresada durante el desarrollo de células B, por tanto, se asocia con una respuesta inmune primaria y se utilizan con frecuencia para diagnosticar la exposición aguda a un inmunógeno o patógeno.



**Figura 7. Respuesta humoral: funciones de los anticuerpos.** (Revista Médica Clínica Las Condes. 2012; 23:446-57)

La primera vez que el receptor entra en contacto con el antígeno, la respuesta humoral se denomina *primaria*, se secreta inicialmente una única clase de IgM en forma monomérica y

## Introducción

con idéntica especificidad antigénica y tras unos días se asiste a una conmutación isotópica y se secretan clases distintas de inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG. Algunas de estas células B activadas durante este primer contacto, sobrevivirán como células de memoria de vida larga, listas para ser activadas en exposiciones posteriores al mismo antígeno (respuesta inmune secundaria) produciendo la misma clase de anticuerpos con una mayor afinidad.

Los anticuerpos pueden internalizar los antígenos, procesarlos y finalmente presentárselos a los linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Este tipo de respuesta se denomina *respuesta dependiente de linfocitos T*. El reconocimiento del antígeno por parte de las células T permite el cambio isotípico de IgM a inmunoglobulinas de una clase distinta, IgA, IgE o IgG, dependiendo de las citocinas secretadas por la célula T *helper*, e involucradas en la estimulación de la célula B (Chaplin, 2010), generando linfocitos B *switched*. Durante el cambio de isotipo se requiere la participación de la molécula co-estimuladora CD40 en las células B y del ligando CD40 (CD40L) de las células T.

La *respuesta independiente de linfocitos T* es inducida por antígenos que tienen numerosos epítomos repetitivos (principalmente polisacáridos) que se unen a múltiples receptores de las células B y las activan directamente para secretar anticuerpos IgM. Sin embargo, como no hay formación de centro germinal, ni maduración de afinidad, esta respuesta carece de variación isotópica y no deja memoria. Por lo tanto, las respuestas independientes de células T son IgM limitadas, de poca especificidad y de corta duración (Parkin & Cohen, 2001).

### 3.1.2 Respuesta celular

La respuesta celular, como ya se ha dicho anteriormente, queda a cargo de los linfocitos T. El papel fundamental de los linfocitos T es reconocer las células infectadas, tras la identificación de los antígenos específicos, y destruirlas. El proceso de desarrollo y maduración de las células T comienza con las células madre hematopoyéticas en el hígado fetal y más tarde en la médula ósea donde las células madre se diferencian en progenitores linfoides comunes. Solo un pequeño subconjunto de células pluripotentes migra al timo y se diferencia en progenitores tímicos tempranos (Yang et al.,2010).

Aunque los linfocitos B, con su propio receptor, son capaces de reconocer el antígeno libre, los linfocitos T necesitan de células denominadas células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen-Presenting Cell*) para que sea identificado. Las células dendríticas, los macrófagos y las células B también pueden funcionar como una APC.

Cuando se detecta un patógeno, las APC lo fagocitan y lo digieren. Una vez se ha producido la fagocitosis, los componentes se descomponen en fragmentos que se cargaran luego en moléculas denominadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI) o clase II (MHCII), y, finalmente, se transportan a la superficie celular para ser reconocidas.

Los receptores de los linfocitos T, TCR (*T cell receptor*) son los encargados de reconocer el antígeno. Los TCRs están formados por dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ , que se disponen una al lado de la otra unidas por puentes de disulfuro. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  están asociadas sobre la membrana celular a un conjunto de moléculas denominadas CD3 (del inglés, *Cluster of Differentiation 3*) (Salmond et al., 2009). Para evitar el desencadenamiento de mecanismos destructivos contra las células propias infectadas, el complejo  $\alpha\beta$  TCR-CD3 reconoce péptidos derivados de proteínas extrañas que están unidas al MHC.

Para asegurar una activación adecuada y completa de los linfocitos T, la sola unión del TCR al complejo antígeno-MHC no es suficiente, también, se requiere la estimulación por parte de otras moléculas co-estimuladoras que se unen a co-receptores que se encuentran en la superficie de las células T que envían señales tras la activación del TCR. Las principales moléculas co-estimuladoras del APC son CD80, CD86 y CD40, que se unen a los co-receptores presentes en linfocitos T CD28, CTLA-4 y CD40L respectivamente. (Parkin & Cohen, 2001). La mayoría de los linfocitos T expresan CD28 (CD28<sup>+</sup>), sin embargo, existe una población celular que no expresa la molécula co-estimuladora (CD28<sup>-</sup>), y que poseen un papel proinflamatorio o regulador según el subtipo de linfocito T (Lee y Lee., 2016; Tulunay et al., 2008).

Tras la activación por el receptor de células T y la señalización mediada por citocinas, las células T *naïve* se diferencian a subtipos de células efectoras o linfocitos de memoria. Los linfocitos de memoria aseguran una protección inmediata en los tejidos periféricos y

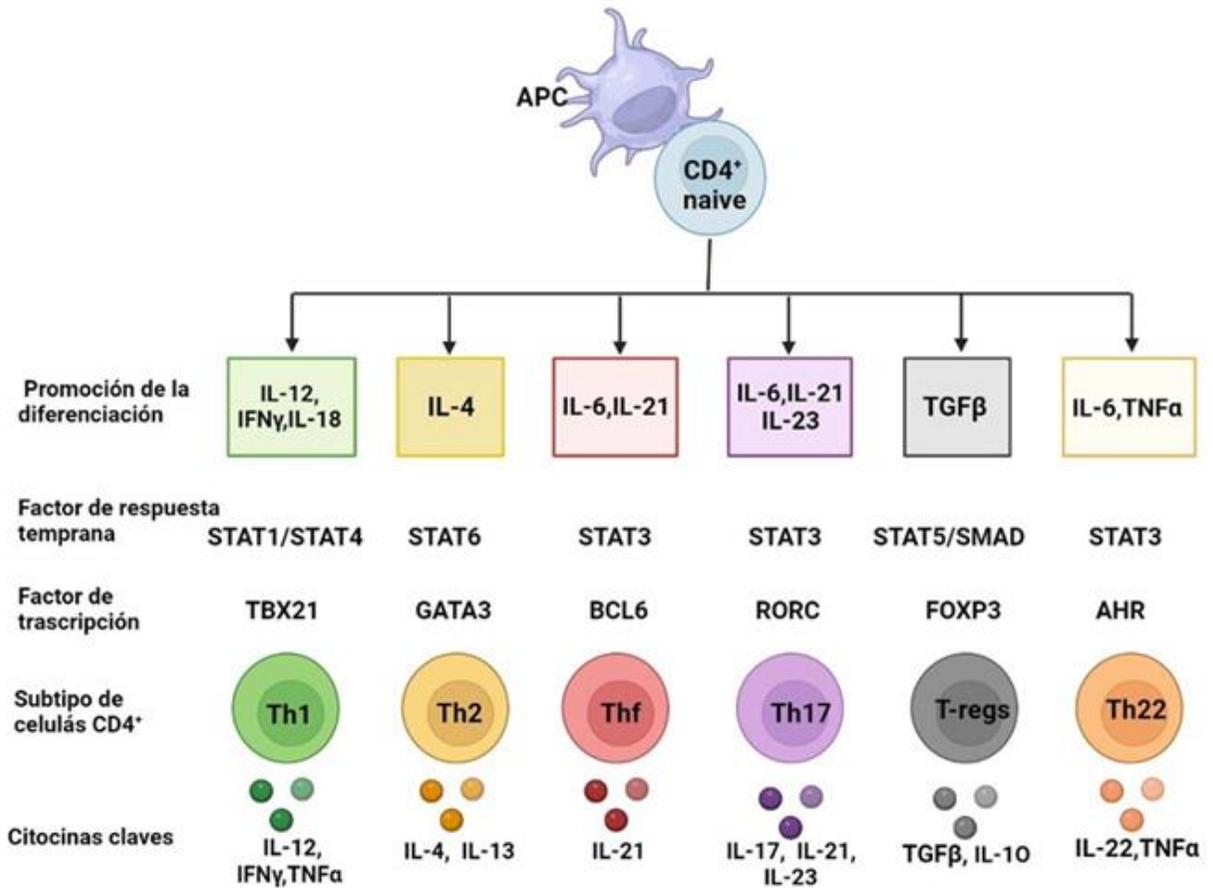
## Introducción

responden al ataque de los antígenos en los órganos linfoides secundarios. A su vez, los linfocitos de memoria se pueden distinguir, por expresión de los marcadores de membrana CD62L y CCR7, en linfocitos de memoria central ( $T_{CM}$ ) y linfocitos de memoria efectora ( $T_{EM}$ ). Los TCM son  $CD62L^+CCR7^+$  y los TEM son  $CD62^-CCR7^-$  y tienen función complementaria frente a una segunda infección: los de memoria efectora tienen una respuesta inmediata en los tejidos periféricos inflamados y los de memoria central, aunque tienen poca o ninguna función efectora, se diferencian rápidamente a células efectoras en respuesta a una estimulación antigénica (Sallusto et al., 2004).

Los principales subtipos de linfocitos T se definen por la expresión en membrana de las moléculas CD4 (linfocitos T *helper* (Th) o efectores) y CD8 (linfocitos citotóxicos o citolíticos (Tc)). Los Th ( $CD4^+$ ) reconocen el péptido unido al MHC de clase II y los Tc ( $CD8^+$ ) el que se une al MHC de clase I (Chaplin, 2010). Los linfocitos  $CD4^+$  actúan, sobre todo, por las citocinas que secretan y las moléculas de membrana, que activan a otras células para enfrentarse a los microorganismos patógenos, mientras que los  $CD8^+$  son directamente citotóxicos y producen moléculas que matan directamente las células del hospedador infectadas. Estos últimos se activan tras una infección viral o bacteriana, pero también matan a las células tumorales que expresan antígenos reconocidos como extraños (Chaplin, 2010).

### 3.1.2.1 Diferenciación de los linfocitos T *helper* $CD4^+$

La diferenciación de los linfocitos T *helper*  $CD4^+$  en distintas subpoblaciones celulares está determinada por el tipo y la concentración del antígeno, el tipo de APC y su estado de activación, las citocinas que acompañan la presentación antigénica, y por moléculas co-estimuladoras. Las células  $CD4^+$  pueden producir citocinas y estimular las células B para generar anticuerpos. Se han identificado diferentes fenotipos: Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras (Tregs), y recientemente Th9, Th22 y Th foliculares (Thf). Cada una secreta un perfil de citocinas distinto y tiene funciones diferentes (Figura 8).



**Figura 8. Diferenciación de los linfocitos T helper.** Se muestran las citocinas que promueven la diferenciación de los diferentes subtipos de células CD4<sup>+</sup>, los factores de respuestas temprana e factores de transcripción característicos, así como las citocinas clave producidas por cada subpoblación.

- ❖ **Th1:** estimula la inmunidad celular contra infecciones bacterianas y patógenos intracelulares, y también participa en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. Su diferenciación es inducida por las interleucinas IL-12, IL-18 y el interferón gamma (IFN-  $\gamma$ ), secretadas por las células dendríticas y macrófagos después del reconocimiento de patógenos intracelulares (Zhu et al., 2010; Paul y Zhu, 2010). En general, la respuesta mediada por Th1 depende del factor de transcripción TBX21 (*T-Box Transcription Factor 21*) y de la molécula STAT4. Estas células son productoras de IFN-  $\gamma$ , IL-12 y TNF-  $\alpha$  (Kaiko, 2008) (Figura 8).

## Introducción

- ❖ **Th2:** respuesta dominante en la protección contra patógenos extracelulares y alérgenos. Se diferencia por efecto de la IL-4, que induce la activación intracelular de STAT-6 y de su factor de transcripción GATA-3 (donde G = Guanina, A = Adenina y T = Timina). Las células Th2 secretan citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, que favorecen la producción de anticuerpos, eosinofilia tisular e hiperplasia de los mastocitos (Paul y Zhu, 2010).
- ❖ **Th17:** estas células se encuentran principalmente en la mucosa pulmonar y digestiva. Se activan por la acción combinada de IL-6, IL-21 e IL-23 que inducen STAT3 y el factor de transcripción nuclear RORC (*RAR-related orphan receptor C*) (Figura 8). IL-23 regula la supervivencia y activación de Th17 después de su diferenciación y la expresión de IL-17 (Miossec, 2009). Se ha documentado ampliamente el papel de las células Th17 en la protección de la barrera intestinal, donde regulan y mantienen la homeostasis intestinal tras el ataque microbiano, sea de origen fúngico o bacteriano (Stockinger y Omenetti, 2017). El ambiente inflamatorio generado por las células Th17 está asociado con enfermedades que tienen un importante componente inflamatorio como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la psoriasis, el asma bronquial y el rechazo a trasplantes. Recientemente hay estudios que indican que las Th17 actúan en el cerebro y estarían implicadas en las enfermedades cerebrales asociadas con el deterioro cognitivo (Cipollini et al., 2019). Principalmente producen IL-17A y IL-17F, pero también IL-21, IL-22, IL-23, IL-6, IFN- $\gamma$  y el factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF, *granulocyte monocyte-colony stimulating factor*) (Cipollini et al., 2019).
- ❖ **Th22:** este subconjunto de células T se genera por la acción combinada de la IL-6 y TNF- $\alpha$  que inducen STAT3 y el factor de transcripción AHR (*Aryl hydrocarbon receptor*) (Figura 8). Las células Th22 se caracterizan por la secreción de IL-22 y TNF- $\alpha$ . El perfil transcripcional de estas células también incluye genes que codifican para FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), IL-13 y quimiocinas implicadas en la angiogénesis y la fibrosis. El principal factor de transcripción asociado a este fenotipo es la AHR. Las células Th22 presenta un papel importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias de la piel (Eyerich et al, 2009).

- ❖ **Células T foliculares (Thf):** estas células T inducen la formación de centros germinales, y ayudan a las células B en la producción de anticuerpos con diferentes isotipos y en el desarrollo de células B de memoria. Las células Thf expresan CXCR5 que, junto con la pérdida del receptor CCR7, les permite migrar a los folículos de células B ricas en CXCL13, donde proporcionan señales para la diferenciación de estas células. El desarrollo de las células T foliculares depende de IL-6, IL-12 e IL-21. El factor de transcripción BCL6 (*B-cell lymphoma 6*) actúa, en conjunción con otros factores de transcripción antagónicos durante la diferenciación de células Thf, tras la activación de STAT3 y la acción de las interleucinas 6 e IL-21. Además, secretan citocinas como IL-21, IL-4 e IL-10 que inducen la diferenciación de células B y la producción de anticuerpos (King, 2009).
- ❖ **Células T reguladoras (Tregs):** las células T reguladoras representan del 5% al 10% de las células T CD4<sup>+</sup> en adultos sanos. Representan una población heterogénea de células que se pueden dividir en dos grupos por su mecanismo de acción y origen: Tregs naturales, que tienen origen en el timo, y células Tregs inducidas, que se diferencian en la periferia (Sakaguchi et al, 2009). Las células Tregs expresan CD25 en superficie inducido por STAT5, el factor de transcripción FOXP3 (forkhead box P3), esencial para su desarrollo, inducido por SMAD2/3 y por la acción del factor TGF- $\beta$  (Burchill et al., 2007). La producción de células de Tregs es esencial en la prevención de enfermedades autoinmunes. Estas células llevan a cabo su función reguladora mediante la liberación de moléculas reguladoras como IL-10, TGF- $\beta$ , IL-5 y adenosina, que inhiben la secreción de citocinas específicas de los fenotipos Th1, Th2 y Th17, además, mediante la liberación de granzimas y perforinas que inducen la apoptosis de la célula efectora (Burchill et al., 2007).
- ❖ **Th9:** TGF- $\beta$  e IL-4 promueven la diferenciación de las células Th9 que producen IL-9 e IL-10 y no expresan citocinas ni factores de transcripción de los subconjuntos Th1, Th2 o Th17. IL-9 (Ma CS, 2010). Durante procesos alérgicos e infecciones por helmintos, la IL-9 estimula la liberación de productos de mastocitos e induce indirectamente la producción de moco, eosinofilia tisular y contracción muscular.

## Introducción

### 3.2 Papel de los monocitos y macrófagos

Los monocitos son esenciales para el control eficaz de la defensa innata y la eliminación de las infecciones virales, bacterianas, fúngicas y protozoarias. Sin embargo, los monocitos también pueden contribuir a la patogénesis de enfermedades inflamatorias y degenerativas (Shi y Pamer, 2011).

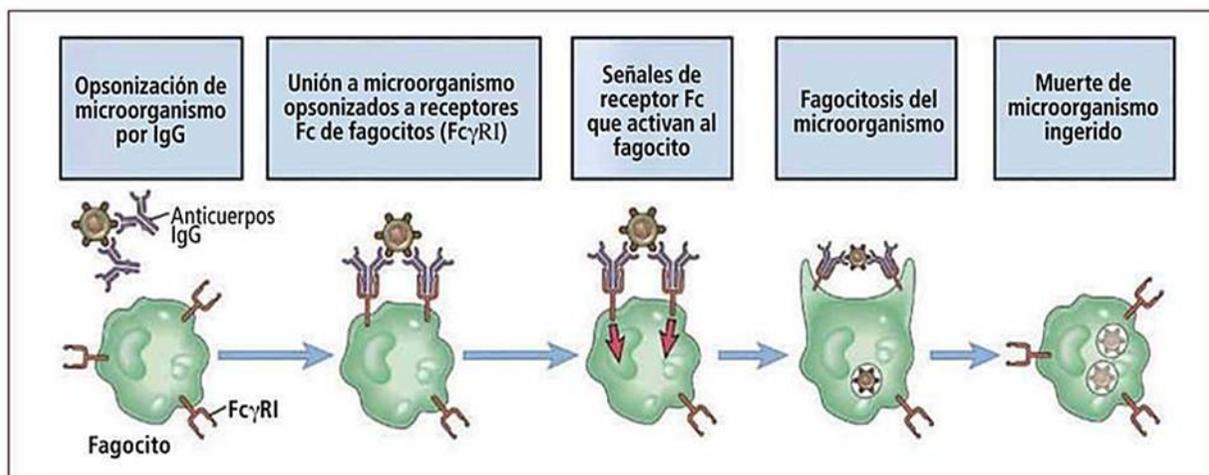
Entre las poblaciones de monocitos, se encuentran los monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), los intermedios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) y los no-clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>). En individuos sanos, los clásicos son la subpoblación de monocitos más abundante en la sangre, constituyen el 90-95% de los monocitos circulantes, respecto a los monocitos intermedios y no clásicos, que constituyen cerca el 5% de los monocitos totales. Los monocitos clásicos e intermedios se caracterizan por una mayor expresión de los receptores de quimioquinas CCR2 y CCR7 y niveles bajos de CX3CR1, mientras que los monocitos no clásicos presentan grandes cantidades de CX3CR1 y una menor expresión de CCR2 (Shi y Pamer, 2011). En general los monocitos clásicos tienen actividad fagocítica y antimicrobiana; los intermedios, por su capacidad de producir citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23, tienen actividad predominantemente proinflamatoria, y por último los monocitos no-clásicos poseen actividad antiinflamatoria y producen principalmente IL-10.

Durante el proceso de inflamación, los monocitos migran desde la sangre hasta los tejidos linfoides en respuesta a un daño tisular causado por la inflamación. Una vez allí, producen citocinas proinflamatorias y fagocitan células apoptóticas y moléculas tóxicas. Además, pueden diferenciarse a macrófagos, y en función del ambiente, se diferencian a macrófagos de tipo M1 o proinflamatorios o a macrófagos de tipo M2 o antiinflamatorios (Boscá et al., 2015).

Los macrófagos están ampliamente presentes en el cuerpo humano y controlan la homeostasis y la invasión de patógenos. Sus principales funciones son la fagocitosis para luego producir la lisis bacteriana y degradación de antígeno a péptidos (Figura 9).

El lipopolisacárido microbiano (LPS) puede favorecer la polarización de los macrófagos al fenotipo M1, mientras que IL-4, IL-13 y IL-10 pueden inducir la polarización de los macrófagos a M2. Los macrófagos M1 producen factores proinflamatorios como IL-6, IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF). En cambio, los M2 expresan la enzima arginasa-1 (Arg-1) y la interleucina 10 antiinflamatoria (IL-10).

En los tejidos infectados, los macrófagos se polarizan primero a un fenotipo M1 proinflamatorio para ayudar al huésped contra los patógenos. Posteriormente, se polarizan al fenotipo M2 antiinflamatorio y desempeñan un papel importante en la reparación del tejido dañado, angiogénesis y el metabolismo (Yunna et al., 2020). Otro papel importante de los macrófagos es que actúan como células presentadoras de antígenos, para que los linfocitos puedan detectarlos y desencadenar una respuesta inmunitaria específica.



**Figura 9. La función principal de los macrófagos: opsonización y fagocitosis.** (Revista Médica Clínica Las Condes. 2012; 23:446-57)

## Introducción

### 3.3 Las citocinas: moduladores claves de la inmunidad

Tanto al inicio, como en la fase efectora de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, las células del sistema inmunitario interactúan entre sí y con otras células por la acción de proteínas llamadas citocinas.

Las citocinas actúan sobre las células a través de receptores de la superficie celular. La unión de las citocinas con su receptor específico provoca una respuesta celular mediante la fosforilación de proteínas celulares. Estas proteínas fosforiladas activan factores de transcripción que, en última instancia, conducen a la transcripción de determinados genes y a la síntesis de nuevas proteínas que son las que ejercerán el efecto biológico correspondiente. Los receptores de citocinas se agrupan en seis familias principales: receptores de citocinas de clase I, receptores de citocinas de clase II, receptores de TNF, receptores de IL-1, receptores de tirosina quinasa y receptores de quimiocinas (Wang et al., 2009). Los receptores de clase I, también conocidos como receptores de hematopoyetina, constituyen el grupo más grande de la familia de receptores de citocinas y utilizan la vía de transducción de la señal mediada por JAK-STAT (por su sigla en inglés, *Janus kinases* [JAKs], *signal transducer and activator of transcription proteins* [STAT]). En respuesta a la unión con la citocina, el receptor dimeriza y une la subunidad citoplasmática, que a su vez activa JAKs. Estas últimas quinasas activan los factores de transcripción STAT que, finalmente, llegan al núcleo y activan los genes para la diferenciación y el ciclo celular.

Dentro del grupo de las citocinas se incluyen los factores de necrosis tumoral, las interleucinas, los interferones, los factores de crecimientos y las quimiocinas.

#### ➤ **Factor de necrosis tumoral- $\alpha$**

Una de las citocinas proinflamatorias más estudiada e importante en la patogénesis de distintas enfermedades inflamatorias es el factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , **TNF- $\alpha$** , producida principalmente por monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células endoteliales y células T. TNF- $\alpha$  se reconoció inicialmente como un factor que causa la necrosis de los tumores, pero hoy se sabe que tiene efectos pleiotrópicos sobre diferentes tipos de células. Se ha identificado como un importante regulador de las respuestas inflamatorias y se

reconoce su papel en la patogénesis de distintas enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Bradley,2008). Por tanto, los inhibidores de TNF- $\alpha$  han mostrado una potencia notable en una variedad de enfermedades autoinmunes (Jang et al, 2021).

### ➤ Interleucinas

La **IL-6** es otra interleucina proinflamatoria que tiene un efecto pleiotrópico sobre la inflamación, la respuesta inmune y la hematopoyesis, producida por fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y linfocitos (Gabay, 2006). La IL-6 juega un papel importante en la respuesta inmune adaptativa por la estimulación de la producción de anticuerpos y del desarrollo de células T efectoras. Además, la IL-6 puede promover la diferenciación o proliferación de varias células no inmunes (Tanaka et al., 2014).

La **IL-17** es la principal citocina producida por las células Th17, pero también producida por macrófagos, células dendríticas y células NK. Durante la respuesta inflamatoria, la vía de señalización IL-17 es capaz de mejorar la producción de citocinas y quimiocinas, promover la respuesta proinflamatoria y aumentar células inmunes en el sitio de la infección (Cipollini et al, 2019). Estudios previos han demostrado que, tanto en las células endoteliales de cerebro humano como en líneas celulares endoteliales de cerebro murino, la IL-17 alteraba la integridad de la BHE, por activación de los receptores que aumentan la permeabilidad (Kebir et al., 2007, Huppert et al., 2010). Después de la inducción de las citocinas IL-17 e IL-22, las células endoteliales de la BHE secretan CCL2 (o MCP-1), promoviendo la infiltración de linfocitos CD4<sup>+</sup> (Kebir et al., 2007). La ruptura de la BHE favorece la entrada en el SNC de las células inmunitarias periféricas, incluyendo células Th17, neutrófilos y otras células inmunes. En el SNC, la IL-17 tiene efectos directos sobre las neuronas y los oligodendrocitos dañándolos, y en microglía y astrocitos causa la liberación de citocinas inflamatorias, amplifica la producción de especies reactivas de oxígeno y promueve la quimiotaxis y la acumulación de neutrófilos (Cipollini et al, 2019).

La **IL-1 $\beta$** , junto con la IL-1 $\alpha$ , fue la primera interleucina descubierta entre las once interleucinas pertenecientes a la familia de la IL-1. Es liberada principalmente por monocitos y macrófagos, así como por células no inmunes, tales como fibroblastos y células endoteliales, durante una lesión celular, infección o inflamación. Curiosamente IL-1 $\beta$  está

## Introducción

implicada en el mantenimiento de las respuestas inmunes y contribuye a la gravedad de una variedad de enfermedades del SNC que van desde la esclerosis múltiple, enfermedades neurodegenerativas, lesión cerebral traumática, y retinopatía diabética. Además, el bloqueo farmacológico de la señalización de la IL-1 ha demostrado ser beneficioso en algunas enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias, haciendo de la IL-1 $\beta$  una diana terapéutica prometedora en condiciones neuroinflamatorias (Mendiola y Cardona, 2018).

Otro miembro de la familia de la interleucina-1 es la **IL-18**, una citocina proinflamatoria producida por monocitos y macrófagos. Originalmente se descubrió como un factor de inducción de IFN- $\gamma$  a partir de células Th1, NK y células NKT CD4<sup>+</sup>, que expresan IL-18R. Esta producción de IFN- $\gamma$  aumenta notablemente en presencia de la IL-12 (Yasuda et al.,2019). De manera similar, los linfocitos B estimulados por IL-12 también mostraron un aumento de la expresión de IL-18R y la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a IL-18 e IL-12 (Yoshimoto et al.,1998). Además, en presencia de IL-2, pero en ausencia de IL-12, IL-18 estimulaba a las células NK, las células NKT CD4<sup>+</sup> y las células Th esplénicas para producir IL-3, IL-9 e IL-13. Finalmente, la IL-18 juega un papel importante en la defensa contra diferentes microorganismos infecciosos, tanto por la inducción de IFN- $\gamma$ , óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno en los fagocitos, como por la producción de citocinas Th2 antiinflamatorias (Yasuda et al.,2019).

Las citocinas **IL-12** e **IL-23**, ambas miembros de la familia de la interleucina-12, son citocinas proinflamatorias que contribuyen al desarrollo de las células Th1 y Th17, respectivamente. La IL-12 es producida por las células dendríticas, macrófagos y células B y tiene un papel importante en la inducción de INF- $\gamma$  por las células T y células NK. La IL-23 también es producida por células dendríticas y macrófagos activados en respuesta a los patógenos microbianos. Juega un papel clave en el desarrollo de Th17, al estabilizar la expresión de IL-17 y el fenotipo Th17, pero no es un factor de diferenciación para Th17 (Vignali y Kuchroo, 2012).

La **IL-21** es producida principalmente por los Th foliculares. Es capaz de inducir la expresión de más IL-21 e IL-17 y favorece la diferenciación de las Th17 e inhibe las Tregs.

La IL-21 principalmente controla la maduración de los linfocitos B en los centros germinales.

La **IL-15** es producida por una gran variedad de células T y monocitos. Tiene una amplia gama de funciones, incluyendo la estimulación de las células T y proliferación de las células NK. Además, promueve la expansión de las células B y la producción de inmunoglobulina. Es de destacar también su propiedad quimioatrayente de linfocitos T (Shaikh, 2011).

La **IL-22** es un miembro de la familia de IL-10 que originalmente se pensó que se expresaba predominantemente en las células Th1. Recientemente se ha demostrado que las células Th17 cultivadas *in vitro* también producen IL-22, y la producción *in vitro* se incrementa en presencia de IL-23 (Liang et al. 2006). Kebir et al., mostraron que tanto la IL-22 como la IL-17, inducen la ruptura de la BHE y promueven el reclutamiento de linfocitos CD4<sup>+</sup> adicionales (Kebir et al., 2007).

La **IL-10** es producida por monocitos de tipo no clásico (antiinflamatorio) y también linfocitos B y T, principalmente T reguladoras. IL-10 se considera una citocina antiinflamatoria, que contribuye significativamente al mantenimiento y restablecimiento de la homeostasis inmune. Sin embargo, presenta funciones pleiotrópicas, de hecho, puede promover las respuestas inmunitarias, apoyando la activación de células B y células T CD8<sup>+</sup> (Bedke et al., 2019).

La citocina **IL-13**, liberada por las células Th2, tiene acción antiinflamatoria inhibiendo diferentes mediadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  (Miossec y van den Berg, 1997). Estudios previos mostraron que la IL-13 cambió el estado de activación de la microglía/macrófagos hacia el fenotipo protector tipo M2 polarizado en trastornos neurodegenerativos (Hamzei Taj et al, 2018). Hay estudios que indican que la IL-13 induce fibrosis tisular estimulando y activando la TGF $\beta$  (Lee et al., 2001).

La **IL-4** es producida por células T, mastocitos, y basófilos. Induce la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a células Th2, inhibiendo el desarrollo de las Th1. En las células B, promueve el cambio de la clase de inmunoglobulina a IgG1 e IgE, acción antagonizada por IFN- $\gamma$  (Kühn et al., 1991). En un estudio reciente de Steel et al., se probó una aplicación de una proteína de fusión, compuesta por IL-4 e IL-10, (*IL-4-10 fusion protein*) en la artritis

## Introducción

reumatoide, con resultados beneficiosos por la inhibición *in vitro* de la secreción de citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8.

### ➤ Interferones

Los interferones se pueden diferenciar en dos tipos, interferones tipo 1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), con actividad antiviral, e interferones tipo 2 o  $\gamma$  con funciones proinflamatorias. En particular el interferón  $\gamma$ , **IFN- $\gamma$** , aumenta la sensibilidad del sistema inmunológico y la respuesta a los patógenos estimulando la función linfocitaria (Schroder, 2003).

### ➤ Factor de Crecimiento Transformante $\beta$

El Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (**TGF- $\beta$** , del inglés *Transforming Growth Factor- $\beta$* ) es una proteína que pertenece a la superfamilia de los factores de crecimiento y que presenta multitud de funciones. Es sintetizado por varios tipos de células inmunes, tales como linfocitos, macrófagos y células dendríticas. Aunque inicialmente se pensó que estimulaba la proliferación celular, rápidamente se confirmó que TGF- $\beta$  es un regulador bifuncional que inhibe o estimula la proliferación celular. Se ha descrito que tiene una función reguladora, de hecho, TGF- $\beta$ , en combinación con IL-2, induce la diferenciación de células Tregs a través de la inducción de la expresión de Foxp3 en células T CD4<sup>+</sup> (Chen et al. 2003; Liu et al. 2008). Sin embargo, en combinación con IL-6 o IL-21, promueve el desarrollo de células Th17, y la proliferación de células proinflamatorias (Morikawa et al., 2016).

### ➤ Quimiocinas

Otro subgrupo de citocinas con estructura similar y que regula la migración y la adherencia se denominan quimiocinas.

**CCL20**, también conocido como MIP-3 $\alpha$  o LARC, se expresa en tejidos periféricos, incluyendo la piel, mucosas (pulmón e intestinos), hígado y timo. A diferencia de otras quimiocinas, CCL20 tiene solo un receptor conocido, CCR6 expresado en células dendríticas y células T. Recientemente se ha demostrado que CCR6 es un marcador representativo de células Th17 circulantes, por lo tanto, el eje CCL20/CCR6 juega un papel

crucial en el reclutamiento de células Th17 en los tejidos locales. Su producción es aumentada por TNF- $\alpha$  e IL-17A y IL-22 (Furue et al.,2020).

**CCL2**, llamada también MCP-1, a través de las interacciones con su receptor CCR2, es la quimioquina más potente que regula la migración y la infiltración de monocitos/macrófagos (Sozzani et al., 1994). En la progresión de la enfermedad de Alzheimer, el MCP-1 se expresa principalmente por microglía y macrófagos, que están implicados en la eliminación de beta-amiloide (A $\beta$ ), degradación de la mielina y pérdida neuronal (Britschgi y Wyss-Coray, 2007).

La quimiocina **CCL5** es específica de los receptores CCR1, CCR3 y CCR5. Se conoce también por el acrónimo inglés RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*) por el hecho que en un primer momento se creía que estaba secretada por linfocitos T. CCL5 es una molécula quimiotáctica potente para monocitos y células T y eosinófilos y juega un papel importante en la inflamación y en las respuestas inmunitarias (Marques et al., 2013). Diferentes estudios en ratones mostraron que la unión de CCL5 a los receptores CCR1 y CCR5 en el hígado inducía directamente esteatosis y factores proinflamatorios en hepatocitos promoviendo el desarrollo de la fibrosis hepática (Moreno et al., 2005).

Finalmente, **CX3CL1**, también conocida como fractalquina, se sintetiza en las células endoteliales, estimuladas por TNF $\alpha$ , IL-1, LPS e INF $\gamma$ , como una proteína de membrana con un dominio N-terminal que se secreta. Su receptor específico CXCR1 se expresa en monocitos y linfocitos. Puede funcionar tanto como una molécula de adhesión para los leucocitos como un factor quimiotáctico por su dominio N-terminal secretado (Imaizumi et al.,2004).

### 3.4 CD69: marcador temprano de activación

La activación de los linfocitos T implica una amplia variedad de cambios celulares, tanto bioquímicos como genéticos. Sin embargo, se distinguen los genes que se expresan inmediatamente (15-30 min después de la estimulación), los tempranos (30 min a 48 h), y

## Introducción

los expresados tarde (2-14 días después de la estimulación). Entre la variedad de genes inducidos, y siguiente activación de las células T, se reconocen varias moléculas de superficie celular (Steven et al., 1994).

El CD69 es el clásico marcador temprano de la activación de linfocitos debido a su rápida aparición en la superficie de la membrana plasmática de las células activadas después de la estimulación. La aparición de CD69 en la membrana plasmática de las células activadas es más rápida que la de CD25; la expresión transcripcional del gen CD69 se detecta temprano después de la activación (30-60 min); sin embargo, disminuye rápidamente después de 4-6 horas (Gonzalez-Amaro et al, 2013).

La expresión del marcador CD69 se induce in vitro en los linfocitos T y B, células NK, macrófagos murinos, neutrófilos y eosinófilos, mientras que se expresa constitutivamente en monocitos humanos, plaquetas y células epidérmicas de Langerhans (Marzio et al., 1999).

Diferentes estudios han revelado la expresión de CD69 en los linfocitos infiltrados en sitios inflamatorios en varias condiciones inflamatorias crónicas humanas, y, por tanto, puede estar implicada en la patogénesis de enfermedades como la artritis reumatoide, las enfermedades inflamatorias crónicas del hígado, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis sistémica, el asma alérgico y la dermatitis atópica. Experimentos con ratones deficientes en CD69 mostraron que la expresión de CD69 modulaba la severidad de diferentes modelos de inflamación murina. CD69 regula algunas funciones específicas de los subtipos de células T; se ha demostrado que el marcador CD69 regula la diferenciación de las células T reguladoras, así como la secreción de IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22 (Cibrián et al., 2017).

Algunos estudios en ratones deficientes en CD69, tanto in vivo como in vitro, demostraron una mayor activación de los linfocitos Th17 de memoria, relacionada con una disminución de la fosforilación de STAT5. Por tanto, la expresión de CD69 en la membrana, activa STAT5, un regulador negativo de la diferenciación Th17, mientras que en ausencia de CD69, la activación de STAT3 y la transcripción de ROR $\gamma$ t, implica un aumento en la diferenciación de las células T *naïve* al subtipo proinflamatorio Th17 (Martín et al., 2010).

### 3.5 Papel de la inflamación periférica en el deterioro cognitivo asociado a la enfermedad hepática

La aparición del deterioro cognitivo en pacientes con cirrosis hepática se asocia con alteraciones específicas en el sistema inmune y de la inflamación periférica. (Mangas-Losada et al. 2017).

En el estudio de Mangas-Losada et al., demostraron que los pacientes con EHM presentan un ambiente proinflamatorio debido al aumento significativo de diferentes citocinas proinflamatorias con respecto a los pacientes sin EHM. Se detectaron también porcentajes mayores de monocitos proinflamatorios y linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria y autorreactivos. En particular el aumento de los linfocitos T autorreactivos CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se asociaba a una mayor concentración de CX3CL1 e IL-15, que podrían favorecer su infiltración en el cerebro. Además, los pacientes con EHM tenían mayor expresión del marcador de activación temprana CD69, en todos los subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos B. El aumento de la activación de las células B se correlacionaba con los niveles elevados de IgG séricas en este grupo de pacientes. Finalmente, mostraron un aumento de la diferenciación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> hacía los subtipos Th22 y Th17, con mayor expresión en células mononucleares de sangre periférica (su sigla en inglés, PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) de los factores de transcripción AHR y BCL6, respectivamente, que podrían favorecer la formación de órganos linfoides terciarios en el cerebro. Teniendo en cuenta estos resultados se propusieron tres mecanismos posibles involucrados en la aparición de la neuroinflamación y deterioro neurológico en pacientes cirróticos con EHM (Mangas-Losada et al., 2017a): infiltración en el cerebro de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activación de receptores de células endoteliales por las interleucinas periféricas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) provocando la liberación de factores inflamatorios en el cerebro; infiltración de los linfocitos Th17 y formación de órganos linfoides terciarios con centros germinales, conteniendo células B. Las alteraciones inmunológicas asociadas a la EHM y los posibles mecanismos propuestos se presentan en la Figura 10.



células inmunes en el hígado, ya sea por señales locales o señales derivadas del tejido adiposo o el intestino, puede promover la respuesta inflamatoria que conduce a la lesión y muerte celular, promoviendo así la progresión de la enfermedad. Al mismo tiempo, la combinación de lipotoxicidad e inflamación determinará una respuesta inmune de las células hepáticas con el objetivo de controlar y reparar el daño sufrido. Para una mejor comprensión, los principales mecanismos de las células implicadas en este proceso se describirán de forma sistemática en los siguientes apartados.

### 4.1 Papel de la inmunidad innata en NAFLD

La activación de la inmunidad innata es un factor clave en la amplificación de la inflamación hepática y, por tanto, en la progresión de NAFL a NASH. La respuesta inmune innata se activa tras el reconocimiento, por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), de estructuras moleculares que son producidas por los microorganismos patógenos, denominadas patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) o moléculas endógenas que producen o liberan células dañadas o apoptóticas, llamadas patrones moleculares asociados a la lesión (DAMP, *damage associated molecular patterns*). Entre los receptores PRR, los más importantes en el desarrollo de la NAFLD son los receptores TLR y los receptores NLR, que se encuentran mayormente en las células de Kupffer y en las células hepáticas estrelladas (Arrese et al., 2016).

A continuación, se activan tanto las KC como las HSC promoviendo la inflamación y la fibrosis respectivamente. En la fase aguda de la enfermedad, las KC se polarizan a su fenotipo activado proinflamatorio (M1) y secretan citocinas proinflamatorias y quimiocinas, como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y las quimiocinas CCL2 y CCL5, promoviendo la progresión de NASH. Sin embargo, en la fase crónica, las KC presentan un fenotipo diferente, ya que la mayoría de estas células se polarizan a su fenotipo antiinflamatorio (M2), liberando citocinas antiinflamatorias como IL-13, IL-10, IL-4 y TGF- $\alpha$  y que interactúan recíprocamente con las células Th2. Se requieren más estudios para entender los mecanismos específicos por los

## Introducción

cuales los macrófagos hepáticos cambian su fenotipo en etapas avanzadas de NASH (Arrese et al.,2016).

En condiciones fisiológicas, las células estrelladas hepáticas se encuentran en su estado inactivo (qHSC, *quiescent-HSC*) con una alta producción de IFN- $\gamma$  a través de la expresión de TLR3. Durante la fase crónica de NASH, las HSC se activan y se diferencian a miofibroblastos, perdiendo la capacidad de producir IFN- $\gamma$  y son considerados los principales impulsores de la fibrosis hepática. La activación de las HSC depende de diferentes factores. Entre todos, los más importantes son TGF- $\beta$  y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF $\beta$ , *platelet-derived growth factor  $\beta$* ) que se liberan por acción de las KC. El TGF- $\beta$  es la citocina fibrinogénica más importante, mientras que PDGF $\beta$  es un importante quimioatrayente para la proliferación y migración de las HSC. Sin embargo, también las HSC son capaces de inducir fibrosis por sí mismas, liberando CCL20 y CCL5, quimiocinas fibrogenicas asociadas a la NASH. Estudios recientes han demostrado que el colesterol libre puede activar las células estrelladas mediante señalización directa con el receptor TLR4 (Arrese et al.,2016).

Las células *natural killer T* aumentan durante el curso de la enfermedad de NASH contribuyendo a la inflamación y fibrosis por secreción de IL-4, IFN- $\gamma$  y osteopontina (OPN), una citocina proinflamatoria que participa en la activación temprana de los linfocitos T y en la proliferación de las células B y, por tanto, a la secreción de los anticuerpos (Arrese et al.,2016).

En NAFLD, los neutrófilos son responsables de la inflamación en curso reclutando monocitos y macrófagos. Además, se infiltran en el hígado y producen daño celular por liberación de especies reactivas de oxígeno y secreción de mieloperoxidasa (Herrero-Cervera et al, 2022).

### 4.2 Papel de la inmunidad adaptativa en NAFLD

Las células dendríticas (CD) son las responsables de la conexión entre la respuesta innata y adaptativa. En un hígado sano, las CD presentan un fenotipo inmaduro y promueven la

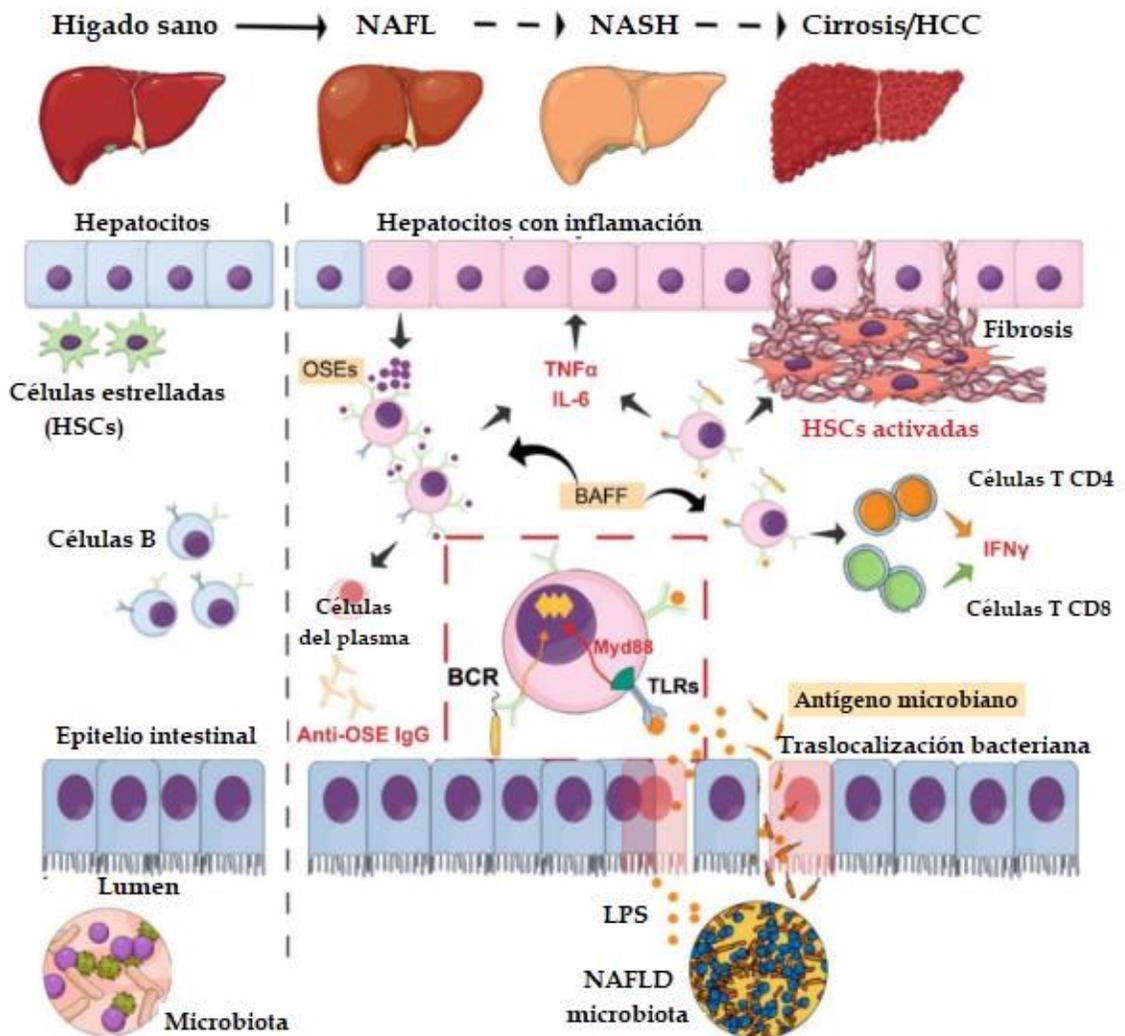
diferenciación de las células T reguladoras (Tregs) gracias a la secreción de citocinas como IL-10 e IL-27 (Bernsmeier et al.,2017). En un ambiente proinflamatorio debido al desencadenamiento de la NASH, las CD maduran y secretan citocinas proinflamatorias, induciendo la respuesta inmune adaptativa por activación de las células T CD4<sup>+</sup> específicas del antígeno y las células T CD8<sup>+</sup>, citotóxicas (Lukacs-Kornek et al.,2013). Las CD, a través de las moléculas de clase I y II del MHC, presentan el antígeno a los receptores TCR, receptores de las células CD4<sup>+</sup>, y al co-receptor CD3, favoreciendo la activación de las células Th1 y Th17. (Sutti et al.,2020). En diferentes estudios se ha asociado el desarrollo de la esteatohepatitis hepática a un aumento de las células Th17, y, por tanto, a una mayor expresión de IL-17 e IL-22 (Giles et al.,2016; Rollas et al.,2016).

En cuanto a las células T citotóxicas, CD8<sup>+</sup> su papel no está claro y se requieren más estudios para confirmar su función en la progresión de la patología. En modelos animales y en humanos se ha demostrado una importante infiltración hepática de estas células durante la evolución de NAFL a NASH. Además, se ha sugerido que las CD8<sup>+</sup> pueden interferir con el inicio de la inflamación por activación de las HSC (Bhattacharjee et al.,2017; Wolf et al.,2014).

Finalmente, el papel de las células B en NAFL y NASH todavía no está claro. Como se resume en la Figura 11, las células B intrahepáticas podrían tener una función profibrogénica e inflamatoria de las células B intrahepáticas. (Barrow et al, 2021).

Las células B intrahepáticas promueven la enfermedad a través de la producción de citocinas y de anticuerpos y modulando la activación de las células T. Las células B pueden promover la fibrogenesis hepática como demostraron en un estudio en ratones tratados con CCL4 deficientes en células B. La ausencia de células B atenuaba sustancialmente la fibrosis hepática, con menor activación de HSC e infiltración de células inmunes. El papel profibrótico de las células B depende de la proteína adaptadora, Myd88, (*myeloid differentiation primary response*), que es indispensable para la inmunidad innata y participa en la vía de señalización del ácido retinoide (Thapa et al.,2015).

## Introducción



**Figura 11. El papel de las células B en la progresión de la NAFLD.** Las células B intrahepáticas promueven la enfermedad a través de la producción de citocinas y anticuerpos. BAFF (factor activador de células B) y OSE (epítomos derivados del estrés oxidativo) están involucrados en la activación de las células B. Los factores microbianos derivados del intestino activan las células B intrahepáticas de una manera dependiente de Myd88. La activación de células B también puede ocurrir de manera específica a través de la señalización del BCR (receptor de células B). Las células B activadas promueven la progresión de NASH a través de la modulación de la activación de células T CD4 y CD8 y las respuestas IFN- $\gamma$ . (Modificado de Barrow et al, 2021)

En un estudio con ratones alimentados con dieta alta en grasa para inducir la NAFLD, se demostró que las células B intrahepáticas secretaban concentraciones más altas de IL-6 y

TNF- $\alpha$  respecto al grupo control, y promovían la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> en células Th1 (Zhang et al.,2016). Posteriormente, Bruzzi et al, en biopsias de hígado de pacientes con NASH evidenciaron la presencia de células B en los agregados celulares ricos en linfocitos T, sugiriendo un posible papel de las células B en la activación de la respuesta celular. En estos sujetos, la infiltración de los linfocitos B/T se correlacionó tanto con los niveles de IgG circulantes que tienen como objetivo los epítomos derivados del estrés oxidativo (OSE) como con los niveles de IFN- $\gamma$ . (Bruzzi et al.,2018).

Sin embargo, la activación de las células B también puede ocurrir de manera específica del antígeno a través de la señalización del receptor de las células B (BCR) (Barrow et al.2021). El factor activador de células B (BAFF) perteneciente a la familia del TNF, es una citocina involucrada en la maduración y supervivencia de las células B. Resultados, tanto en modelos animales como en humanos, sugieren efectos directos de BAFF en el desarrollo de la enfermedad hepática y en el metabolismo del tejido adiposo o efectos indirectos mediados por la supervivencia y maduración de las células B (Bruzzi et al,2018; Nakamura et al., 2019; Miyake et al., 2013). Alternativamente, los cambios en el microbiota en NAFLD pueden influir en la activación de las células B a través de mecanismos que son independientes de la translocación del antígeno. Un aumento de la traslocación intestinal bacteriana a través de un mecanismo dependiente de TLR4, cuya señalización depende de Myd88, puede activar las células B (Barrow et al.2021). Se desconocen los mecanismos de activación de las HSC mediada por células B que conducen a fibrosis en la NASH.

La inmunidad innata y la inflamación periférica desempeñan un papel importante en la patogénesis y desarrollo de la NAFLD, así como también juegan un papel clave en la aparición de alteraciones neurológicas en diversas enfermedades neurodegenerativas. Debido a la reciente asociación entre la NAFLD y la posible disfunción cognitiva, hemos considerado necesario investigar la posible implicación del sistema inmunológico y la inflamación en el desarrollo del deterioro cognitivo leve (DCL) en pacientes con NAFLD, así como los cambios específicos asociados.



## **II. Hipótesis**



La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) está asociada al síndrome metabólico, el cual a su vez ha sido vinculado con la disfunción cognitiva. Sin embargo, estudios recientes sugieren que NAFLD puede ser una causa de disfunción cognitiva independientemente de este factor. Además, los pacientes con NAFLD presentan disbiosis de la microbiota intestinal y alteración de la función del ciclo de la urea, lo que promueve la acumulación sistémica de amonio, que induciría aún más la inflamación sistémica.

A pesar de que varios estudios ya han intentado evaluar las posibles alteraciones cognitivas en pacientes con NAFLD, todavía no está bien definida la metodología para caracterizar y detectar el deterioro cognitivo en estos pacientes, y tampoco se conocen los posibles mecanismos implicados en el desarrollo de las alteraciones cognitivas en pacientes con NAFLD.

En base a todo lo expuesto, nos hemos planteado las siguientes hipótesis:

- ✓ Los pacientes con NAFLD pueden desarrollar deterioro cognitivo leve, que podría detectarse mediante una puntuación basada en test psicométricos específicos.
- ✓ Al igual que en los pacientes cirróticos, la aparición del deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD podría estar asociada a cambios cualitativos específicos en la inflamación periférica y en el sistema inmunitario que podrían desencadenar la inducción de deterioro cognitivo y motor.



## **III. Objetivos**



El objetivo de esta tesis doctoral es desarrollar una nueva metodología para caracterizar el deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD e identificar los posibles cambios en la inflamación periférica asociados a la presencia de alteraciones cognitivas y motoras en estos pacientes.

Para alcanzar estos objetivos abordamos una serie de objetivos concretos:

1. Caracterizar las diferentes alteraciones neurológicas en pacientes con NAFLD mediante test psicométricos que evalúan funciones cognitivas y motoras específicas.
2. Desarrollar una puntuación basada en las alteraciones cognitivas y motoras detectadas para clasificar a los pacientes con NAFLD según la presencia o ausencia de deterioro cognitivo leve (DCL).
3. Caracterizar las alteraciones en el sistema inmunológico en pacientes NAFLD sin y con DCL, analizando los cambios en el inmunofenotipo y posibles alteraciones en las diferentes poblaciones sanguíneas. Analizaremos los siguientes parámetros:
  - Subpoblaciones de monocitos.
  - Poblaciones de linfocitos B y T *helper* (CD4<sup>+</sup>) y T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>).
  - Activación de linfocitos B y T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) medida por el marcador de activación temprana CD69.
  - Diferenciación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> a los diferentes subtipos efectoros: Th1, Th2, Th17, Th22, Tregs, Thf o Th9.
4. Caracterizar los cambios en la inflamación periférica en pacientes con NAFLD sin y con DCL, analizando el perfil de citocinas pro- y antiinflamatorias en plasma.
5. Relacionar los cambios observados en la inflamación periférica y en el inmunofenotipo con las alteraciones neurológicas asociadas a la aparición de la DCL.
6. Estudiar la influencia del daño hepático en las alteraciones observadas, tanto cognitivas como en el sistema inmunitario.
7. Estudiar la capacidad de los parámetros alterados para diagnosticar la presencia de DCL.



## **IV. Materiales y métodos**



# 1 Pacientes y voluntarios sanos

Se incluyeron en el estudio 73 pacientes con NAFLD que fueron reclutados en los Servicios de Medicina Digestiva de los hospitales Clínico y Arnau de Vilanova en Valencia, España. El diagnóstico de NAFLD se evaluó a partir de datos clínicos, bioquímicos y ultrasonográficos. Como grupo control se incluyeron 64 voluntarios sanos una vez que la enfermedad hepática fue descartada por pruebas clínicas, analíticas y serológicas.

Todos los participantes fueron incluidos en el estudio después de firmar un consentimiento informado por escrito. Los protocolos de estudio se ajustaron a las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, y fueron aprobados por los Comités Éticos de ambos hospitales.

## 1.1 Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión para los pacientes fueron:

- Mayores de 18 años.
- Enfermedad del hígado graso no alcohólica.

Los criterios de exclusión para los pacientes fueron:

- Enfermedades psiquiátricas o neurológicas.
- Ingesta reciente (<6 meses) de alcohol.
- Uso reciente (<6 semanas) de drogas que afectan la función cognitiva.
- Uso reciente (<6 semanas) de antibióticos.
- Diagnóstico de otra enfermedad hepática o de hepatocarcinoma.

## **Materiales y métodos**

### **1.2 Extracción de sangre**

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. Las muestras de sangre se recogieron en tubos BD Vacutainer de 6 mL con EDTA como agente anticoagulante (BD Bioscience; Franklin Lakes, Estados Unidos) para la obtención de plasma y en tubos BD Vacutainer de 8 mL sin EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (BD Bioscience) y agar para la obtención de suero (ver apartado 3)

El último tubo de suero se recogió sin garrote, para evitar la formación de microcoágulos que alteren la medida de los niveles de amonio en sangre inmediatamente después de ser obtenido. La rapidez del ensayo es muy importante ya que la concentración de amonio en la muestra aumenta a medida que transcurre el tiempo (ver apartado 4).

Para el estudio de subpoblaciones de leucocitos en sangre total por citometría de flujo, se recogió sangre en un tubo BD Vacutainer de 2,5 mL con EDTA (BD Bioscience) como agente anticoagulante (ver apartado 12).

### **1.3 Realización de los test psicométricos**

Los test psicométricos se realizaron el mismo día de la extracción de la sangre. Los pacientes realizaron una serie de test que se describen en el apartado 5, para el estudio de posibles alteraciones cognitivas y motoras y para la clasificación de los pacientes con o sin deterioro cognitivo leve. Los controles también realizaron esta serie de test para descartar la presencia de deterioro cognitivo leve (ver apartado 5).

## **2 Clasificación de pacientes con NAFLD según daño hepático, en NAFL y NASH**

Para evaluar el grado de enfermedad hepática se utilizaron dos procedimientos diferentes: biopsia hepática y fibroscan.

Los hepatólogos clínicos solicitaron una biopsia hepática a aquellos pacientes que la requerían en función de su situación y los datos clínicos y analíticos. En estos pacientes el grado de enfermedad hepática se evaluó de acuerdo con los criterios habituales en la práctica clínica, según describieron Kleiner y su equipo en 1999 mediante la puntuación NAS (del inglés, *NAFLD Activity Score*) que es la suma de puntuaciones de los siguientes parámetros, según su grado de afectación y localización:

- Esteatosis: 0-3
- Inflamación lobular: 0-3
- Balonización (daño celular): 0-2

**Tabla 2. Parámetros de la puntuación NAS (*NAFLD Activity Score*).**

Característica histológica	Puntuación	Criterio
<b>Esteatosis</b>	0	<5%
	1	5-33%
	2	34-66%
	3	>66%
<b>Balonización hepatocelular</b>	1	No
	2	Menor daño celular
	3	Mayor daño celular
<b>Inflamación lobular</b>	0	No
	1	<2
	2	2-4
	3	>4
<b>NAS</b>	0-2	No NASH
	3-5	<i>Border line</i>
	>5	NASH

NASH, Non-alcoholic steatohepatitis; NAS, NAFLD Activity Score

## Materiales y métodos

El NAS es uno de los pocos sistemas de calificación para NAFLD que ha sido validado (Kleiner et al. ,2005). NAS puede tener una puntuación entre 0 y 8, siendo 0 la puntuación de un hígado más sano y 8 la de un hígado muy afectado. A su vez, este intervalo se subdivide en tres grupos: NAS=0-2, considerándose un hígado sin esteatohepatitis;  $NAS \geq 5$  como NASH (*Non Alcoholic Steatohepatitis*) y,  $NAS=3-4$  como ‘borderline’, en cuyo caso los patólogos profundizan en parámetros más específicos (Tabla 2). La fibrosis (F) tiene una puntuación entre 0-4, pero no tiene carácter diagnóstico, como el NAS, sino que es un parámetro predictivo de la evolución de la enfermedad (Tabla 3).

**Tabla 3. Estadios de fibrosis hepática según la clasificación según Kleiner et al. (1999).**

Grado	Criterio
0	No
1	Perisinusoidal/pericelular o periportal a: Leve (zona 3) b: Moderado (zona 3) c: Portal/periportal
2	Perisinusoidal/pericelular y portal/periportal
3	Puentes de fibrosis
4	Cirrosis

En aquellos pacientes cuya situación no requería la realización de una biopsia hepática, esta no se realizó por cuestiones éticas, y el grado de enfermedad hepática se evaluó utilizando parámetros analíticos no invasivos. En estos pacientes utilizamos la puntuación FibroScan-AST (FAST) cuyo objetivo es diagnosticar a los pacientes con NASH, puntuación de actividad NAFLD elevada ( $NAS \geq 4$ ) y fibrosis avanzada (etapa 2 o superior [ $F \geq 2$ ]). La puntuación FAST combina parámetros analíticos (AST, aspartato-aminotransferasa) y de

elastografía mediante el FibroScan: ‘LSM’ (*Liver Stiffness Measurement*, o rigidez del hígado) y ‘CAP’ (*Controlled Attenuation Parameter*, o parámetro de atenuación controlada). Mediante estos tres parámetros, se ha diseñado una ecuación matemática para calcular la puntuación FAST (Newsome et al., 2020):

$$\text{FAST} = \frac{e^{-1.65 + 1.07 \times \ln(\text{LSM}) + 2.66 \times 10^{-8} \times \text{CAP}^3 - 63.3 \times \text{AST}^{-1}}}{1 + e^{-1.65 + 1.07 \times \ln(\text{LSM}) + 2.66 \times 10^{-8} \times \text{CAP}^3 - 63.3 \times \text{AST}^{-1}}}$$

Una vez evaluado el grado de enfermedad hepática mediante biopsia o FibroScan, los pacientes se clasificaron en NAFL y NASH.

### 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.

Los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante de los tubos y se conservaron a -80°C en alícuotas de diferentes volúmenes.

Para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se utilizaron los tubos con EDTA sin centrifugar y el sedimento de los tubos con EDTA utilizados para la obtención de plasma (ver apartado 7).

### 4 Medida de los niveles de amonio en sangre

Los niveles de amonio en sangre se midieron con el aparato *Ammonia Checker II* (o PocketChem BA; Arkray Factory Inc; Kioto, Japón) que utiliza como reactivo el kit *Ammonia Test Kit II* (Arkray Factory, Inc) a partir de 20 µL de sangre total.

## **Materiales y métodos**

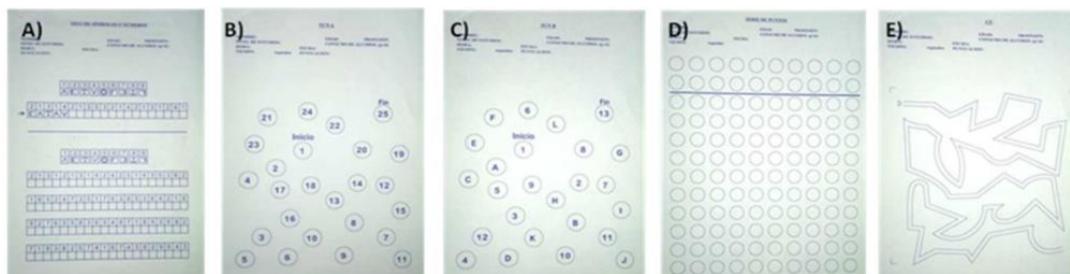
Este kit utiliza tiras reactivas que contienen una capa *receptora* de muestra compuesta de ácido bórico e hidróxido sódico, otra *indicadora* compuesta de verde bromocresol, y un separador poroso. La muestra (20 µL de sangre total recién extraída) se aplica en la capa receptora donde los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) reaccionan con el tampón borato y pasan a amoniaco gaseoso ( $\text{NH}_3$ ); este gas pasa por los poros del distanciador hasta la capa indicadora reaccionando con el verde de bromocresol y produciendo color. La coloración es proporcional a la cantidad de iones amonio iniciales en la muestra. Transcurridos 180 segundos tras aplicar la muestra, se retira el distanciador y se introduce la parte indicadora con la mancha de color hacia abajo en el dispositivo, que dará la concentración de amonio en µmol/L. El rango de detección del aparato es de 7 a 286 µmol/L.

## **5 Test psicométricos para la evaluación neuropsicológica**

Los test psicométricos se realizaron el mismo día de la extracción de sangre. Los pacientes y los voluntarios sanos realizaron la batería de test psicométricos PHES (del inglés, *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*), el “*gold standard*” para el diagnóstico de la EHM en pacientes cirróticos (ver apartado 5.1), y otros test psicométricos más específicos y sensibles para el estudio de alteraciones cognitivas y motoras. (ver apartados 5.2 y 5.3 respectivamente).

### **5.1 PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score)**

Para la clasificación de los pacientes con NAFLD con deterioro cognitivo leve se utilizó la batería de test psicométricos PHES (*Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*) (Wesseinborn et al., 2001; Ferenci et al., 2002). Esta batería comprende 5 pruebas psicométricas que evalúan la concentración, atención, la velocidad motora, percepción visual y orientación visuo-espacial. (Figura 12).



**Figura 12. Batería de test psicométricos PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score).** 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.

A todos los voluntarios sanos y pacientes se les realizó una serie de 5 pruebas psicométricas compuesta por:

- **Test de dígitos y símbolos (*Digit Symbol Test, DST*):** evalúa la velocidad de procesamiento y la memoria de trabajo. El test consiste en vincular símbolos a números correspondientes lo más rápido posible (Figura 12A). El sujeto debe de dibujar el símbolo correspondiente debajo de cada número, basándose en una tabla de referencia. El tiempo requerido para completar la prueba es de 90 segundos. El resultado se registra con el número de ítems realizados correctamente.
- **Test de conexión numérica A (*Number Connection Test-A, NCT-A*):** evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. La prueba consiste en conectar números en orden ascendente (1-25) lo más rápido posible (Figura 12B). Previamente se realiza una prueba en la cual el sujeto debe de realizar el mismo test, pero con los números dispuestos en orden diferente. El tiempo empleado para completar la prueba y corregir cualquier error se expresa en segundos.
- **Test de conexión numérica B (*Number Connection Test-B, NCT-B*):** evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. El test consiste en unir números y letras de forma alternativa uniendo los números en orden ascendente y las letras en orden alfabético (1-A, 2-B, 3-C). Se registra el tiempo que se tarda en finalizar la tarea y corregir cualquier error en segundos (Figura 12C).

## Materiales y métodos

- **Test de puntos seriados (*Serial Dotting Test, SDT*):** evalúa la coordinación visuo-espacial. Consiste en dibujar un punto en el centro de cada uno de los círculos de una serie lo más rápido posible de izquierda a derecha (Figura 12D). El tiempo empleado para completar la prueba se expresa en segundos.
- **Test de línea quebrada (*Line Tracing Test, LTT*):** evalúa la coordinación visuo-espacial. El test consiste en realizar un recorrido con el rotulador entre dos líneas paralelas separadas a 5 mm, con tramos rectos y curvos, intentando no tocar los bordes ni salirse en un tiempo lo más rápido posible (Figura 12E). Para su corrección se utiliza una plantilla con el tramo recorrido dividido en cuadrados, para penalizar con segundos de más el número de cuadrados que el sujeto toca el borde (+1 segundo), se sale del borde del test (+2 segundos), y si se sale del límite de la plantilla (+3 segundos). Los resultados de LTT se expresan en segundos empleados en completar la prueba más el total de errores.

**Cálculo de la puntuación PHES.** La puntuación PHES se calcula a través de una aplicación web: [http://www.redeh.org/TEST\\_phes.htm](http://www.redeh.org/TEST_phes.htm). Gracias a esta aplicación, introduciendo la edad del sujeto, el nivel de estudios, expresado en años dentro del sistema educativo, y la puntuación obtenida en cada prueba, mediante un ajuste por edad y nivel de estudios, se obtiene una puntuación de cada prueba con números enteros, tanto positivos como negativos. La suma de estas puntuaciones nos da la puntuación PHES. El sujeto se clasifica con EHM si la puntuación resultante es  $\leq -4$  (Wesseinborn et al., 2001).

## 5.2 Estudio de alteraciones cognitivas

### 5.2.1 Test d2

El test d2 es una medida neuropsicológica de la atención selectiva y sostenida, la velocidad de exploración visual y concentración mental (Bates y Lemay, 2004; Brickenkamp, 1998, 2009). Es una prueba que consta de una hoja con 14 filas y con 47 ítems cada una, que pueden ser las letras “d” o “p” que llevan de una a cuatro rayas alrededor (Figura 13A- B). Los participantes deben de tachar solo la letra "d" con un total de dos rayas encima o debajo

de ella, en cualquier orden (Figura 13C). Al sujeto se le da 20 segundos para marcar los ítems correctos de cada fila empezando por la parte izquierda.

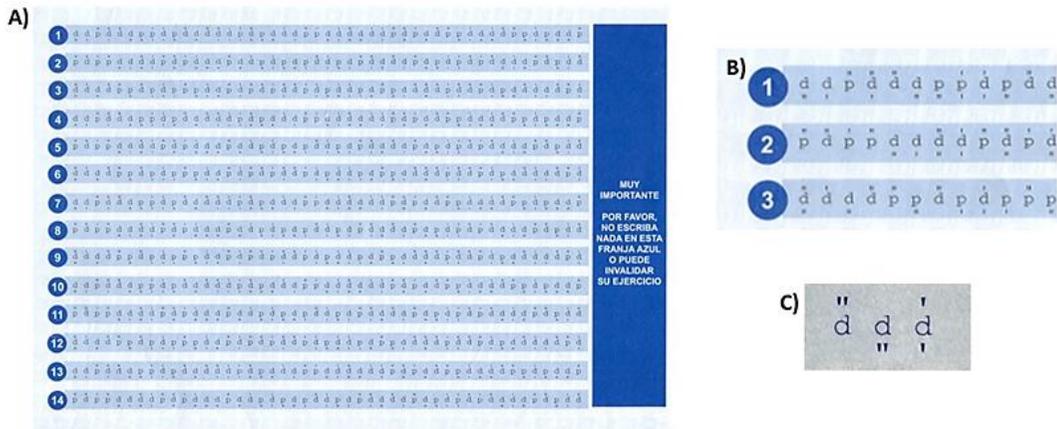


Figura 13. Test d2. A: test d2. B: detalle de filas. C: ítems correctos.

**Corrección y puntuación:** en esta prueba se consideran varios parámetros:

- *Total de respuestas (TR)*: es el número de la casilla en la cual el sujeto marca el último ítem de cada fila. La suma de las TR de las 14 filas nos permite evaluar la velocidad de procesamiento y el total de trabajo realizado durante la prueba.
- *Total de aciertos (TA)*: es el número total de ítems correctos 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 correctos 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 no correctos marcados hasta el último ítem marcado. La suma de los C nos permite evaluar la precisión del procesamiento.
- *Efectividad total de la prueba (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 efectividad de la prueba debida a 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.

## Materiales y métodos

Una vez obtenidos estos parámetros, según la edad del participante, anotamos la puntuación centil (Pc) de cada variable.

### 5.2.2 Test Stroop

El test de *Stroop* (Glaser & Glaser, 1982; Golden, 2001) es una prueba neuropsicológica ampliamente utilizada para el diagnóstico de diferentes patologías neuropsicológicas, como dislexia o esquizofrenia. Este test evalúa la capacidad de atención selectiva, velocidad de procesamiento y el control inhibitorio verbal (Figura 14).

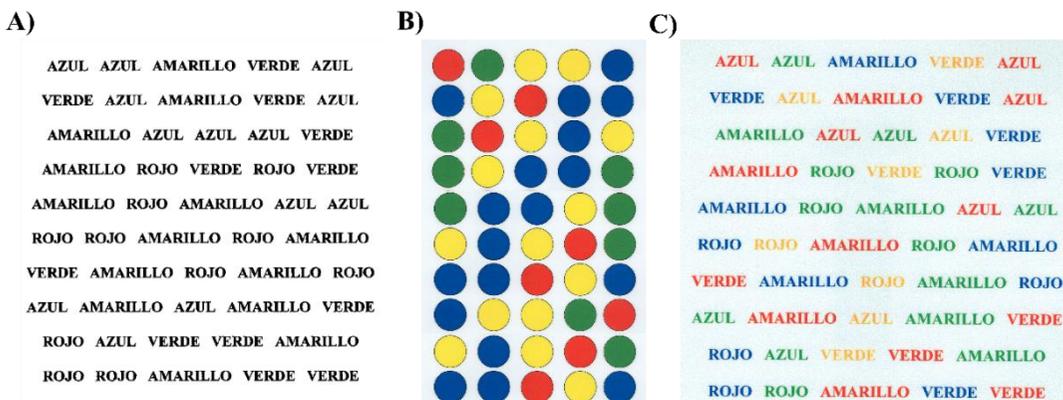


Figura 14. Test Stroop: A: Tarea congruente. B: Tarea neutra. C: Tarea incongruente

El test se compone de 3 pruebas diferentes:

- **Tarea congruente** (Figura 14A): La hoja presenta una matriz de 10 filas de cinco palabras que designan colores (azul, amarillo, verde y rojo), y escritas en tinta negra. El sujeto dispone de 45 segundos para leer tantas palabras como sea posible.
- **Tarea neutra** (Figura 14B): La hoja presenta una matriz de 10 filas de cinco círculos de diferentes colores (azul, amarillo, verde y rojo). El sujeto tiene que nombrar tantos colores como sea posible en 45 segundos.

- **Tarea incongruente** (Figura 14C): La hoja presenta una matriz de 10 filas de cinco palabras que designan colores, pero escritas en una tinta diferente. El sujeto tiene 45 segundos para indicar el color de la tinta de tantas palabras como sea posible.

**Corrección y puntuación:** Se obtienen tres puntuaciones directas que corresponden a cada tarea: número de palabras (P), número de colores (C) y número de palabras-colores (PC). A estas puntuaciones directas se suma un valor constante según el siguiente rango de edad, obteniendo la puntuación corregida (Golden, 2001) (Tabla 4).

**Tabla 4. Puntuación corregida según la edad de los parámetros del test de Stroop.**

	<i>Adulto de 45 a 65 años</i>	<i>Adulto de 66 a 80 años</i>
<b>Palabras (P)</b>	P + 8	P + 14
<b>Colores (C)</b>	C + 4	C + 11
<b>Palabras y Colores (PC)</b>	PC + 5	PC + 15

Tras la medición de estos tres índices P, C y PC se deben realizar unas operaciones matemáticas. Con las dos primeras medidas, P y C, se calcula PC', una estimación de la puntuación que el sujeto debería obtener en la condición de interferencia (PC), donde  $PC' = (C \times P) / (C + P)$ . Posteriormente, la resta entre la puntuación que realmente obtiene en la tarea incongruente (PC) y la estimación de la que debería obtener (PC') es el indicador que informa de cuánto el individuo se deja interferir por el sistema de inhibición de la respuesta automatizada (interferencia). Si la puntuación es positiva, el individuo ha inhibido adecuadamente la respuesta automática y, si es negativa, presumiblemente ha inhibido peor de lo que hubiera sido esperable.

Las puntuaciones directas corregidas y el valor de “interferencia” se utilizan para obtener las puntuaciones definitivas (puntuaciones T), las cuales se interpolan de una tabla de normalidad para la población española (Golden, 2001).

## Materiales y métodos

### 5.2.3 Test oral de claves

El test oral de claves, en inglés *Symbol Digit Modalities – oral Test (SDMT-oral)* evalúa la atención selectiva y la velocidad de procesamiento (Smith, 1968).

CLAVE

⊂	⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊
1	2	3	4	5	6	7	8	9

⊂	⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊												
⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	
⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	
⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	
⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	
⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	⊇	⊈	⊉	⊊	⊃	⊄	⊅	⊆	

Figura 15. Test oral de claves.

Al sujeto se le presenta una tabla de referencia con 9 símbolos, cada uno asociado a un número diferente, desde el 1 al 9. En voz alta, el sujeto tiene que indicar el número correspondiente al símbolo de la hoja, usando la tabla como referencia, con un tiempo límite de 90 segundos (Figura 15).

**Corrección y puntuación:** Se anota el número total de emparejamientos realizados, los aciertos y los errores. La puntuación de aciertos obtenida se corrige por la edad, utilizando tablas normalizadas de referencia (Peña-Casanova et al. 2009).

### 5.2.4 Test oral de dígitos

El test oral de dígitos (*Wechsler Adult Intelligence Scale*, WAIS) (Wechsler, 1955) evalúa la atención selectiva y la memoria de trabajo respectivamente (Figura 16).

Este test consta de dos pruebas:

- *Test de dígitos directos*: el test consta de bloques compuestos de dos series de números aleatorios, y en cada bloque aumenta el número de ítems de la serie, aumentando así el grado de dificultad del test. Al sujeto se le dicen las series de números y este tiene que repetirlos en el mismo orden en el que se le dicen. (Figura 16A)
- *Test de dígitos inversos*: el test se realiza de la misma manera que la prueba anterior, con la diferencia que el sujeto tiene que decir los números en el orden inverso al que se le dicen. (Figura 16B)

**Corrección y puntuación:** Tanto en el test de dígitos directos como en el de dígitos inversos, por cada serie realizada correctamente se suma 1 punto. La prueba termina cuando el sujeto falla en las dos series de un bloque, y la puntuación de cada parte es la suma de las series correctas. La puntuación total de dígitos oral será la suma de la puntuación final de las dos pruebas.

## Materiales y métodos

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

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

### 5.2.5 Test oral de letras y números

El test oral de letras y números (*Wechsler Adult Intelligence Scale*, WAIS-IV) (Egeland, 2015). Este test es más complejo de los test anteriores y evalúa la memoria de trabajo de una forma más exigente (Figura 17).

El test comprende bloques formados por 3 series de ítems compuestos por números y letras aleatorios. Cada bloque aumenta en uno los ítems de la serie. Al participante se le dicen las series y debe de repetirlo en un orden concreto: primero los números, ordenados de menor a mayor, y luego las letras en orden alfabético. (2-A-1-B -> 1-2-A-B)

**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				
	2	6-P 6-P	0 1	0	1	2	3
	3	B-5 5-B	0 1				
2	1	F-7-L 7-F-L	0 1				
	2	R-4-D 4-D-R	0 1	0	1	2	3
	3	H-1-8 1-8-H	0 1				
3	1	T-9-A-3 3-9-A-T	0 1				
	2	V-1-J-5 1-5-J-V	0 1	0	1	2	3
	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				
	2	K-2-C-7-S 2-7-C-K-S	0 1	0	1	2	3
	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				
	2	W-8-H-5-F-3 3-5-6-F-H-W	0 1	0	1	2	3
	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				
	2	5-T-9-J-2-X-7 2-5-7-9-J-T-X	0 1	0	1	2	3
	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				
	2	D-1-R-9-B-4-K-3 1-3-4-9-B-D-K-R	0 1	0	1	2	3
	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.

### 5.3 Estudio de alteraciones motoras

#### 5.3.1 Test de coordinación bimanual

El test utiliza un tablero con perforaciones distribuidas en dos grupos de 4 filas, separados en el medio (Figura 18<sup>a</sup>). Dentro de una parte del tablero hay unas clavijas que se deben pasar a la otra parte del tablero, en la misma posición y fila, de forma simultánea utilizando las dos manos y empezando por los extremos hasta el centro de la fila. Luego se repite la prueba de la misma forma devolviendo las clavijas a la posición inicial. Este ciclo se repite una vez más. Se mide el tiempo que se tarda en cada pase de clavijas (Yela, 1955).

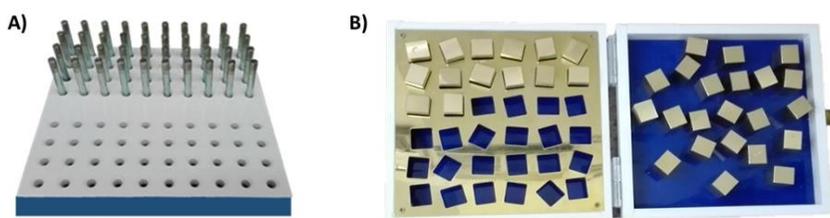
**Corrección y puntuación:** Se suma el tiempo que se tarda en cada ciclo y el total se expresa en minutos.

## Materiales y métodos

### 5.3.2 Test de coordinación visuo-motora

La prueba consiste en un tablero de 6 x 6 huecos rectangulares con orientaciones diferentes donde el sujeto debe encajar unos prismas metálicos, todos del mismo tamaño (Figura 18B). La dificultad del test radica en fijarse bien en la orientación del hueco, para que el prisma pueda encajar. La forma de colocar las piezas 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 el completar la tarea (Yela & López Ladrón, 1956).

**Corrección y puntuación:** Se suma el tiempo que se tarda en cada ciclo y el total se expresa en minutos.



**Figura 18. Test de coordinación motora.** A: test de coordinación bimanual. B: test de coordinación visuo-motora.

## 6 Diseño de una nueva puntuación para detectar el deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD

Para la clasificación de los pacientes NAFLD con o sin deterioro cognitivo, en primer lugar, se utilizó como referencia el PHES (ver apartado 5.1). Según el PHES, solo un 12% de los pacientes presentaban deterioro cognitivo leve. Sin embargo, observamos que realizaron significativamente peor que los controles las otras pruebas psicométricas.

Para identificar a los pacientes con NAFLD que presentaban un rendimiento deficiente en cada parámetro medido por estas pruebas, aplicamos el criterio de la media más o menos dos veces la Desviación Estándar (DE) (**media  $\pm$  2DE**). Este criterio se ha utilizado previamente para identificar a pacientes con desempeño deficiente en pruebas psicométricas (Sharma et al, 2010; Giménez-Garzó et al, 2017).

Utilizamos estos datos para diseñar una nueva puntuación para clasificar a los pacientes como con DCL o sin DCL (ver apartado 1 de Resultados).

### 7 Aislamiento de células mononucleares (PBMC) de sangre total

Las células mononucleares de sangre periférica, en inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC), son células sanguíneas caracterizadas por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos T y B o los monocitos, a diferencia de los granulocitos, con núcleos lobulados, o eritrocitos, sin núcleo. Las células se separan por centrifugación mediante gradiente de densidad utilizando medio Lymphoprep™ (Palex Medical SA, Barcelona, España). Los granulocitos y los eritrocitos tienen una densidad mayor que las células mononucleares y, por lo tanto, sedimentan a través de la capa de Lymphoprep™ durante la centrifugación. Por lo tanto, se crean 4 capas (de arriba abajo): plasma, halo de PBMC, Lymphoprep™ y restos celulares formados por eritrocitos y granulocitos (Figura 19).

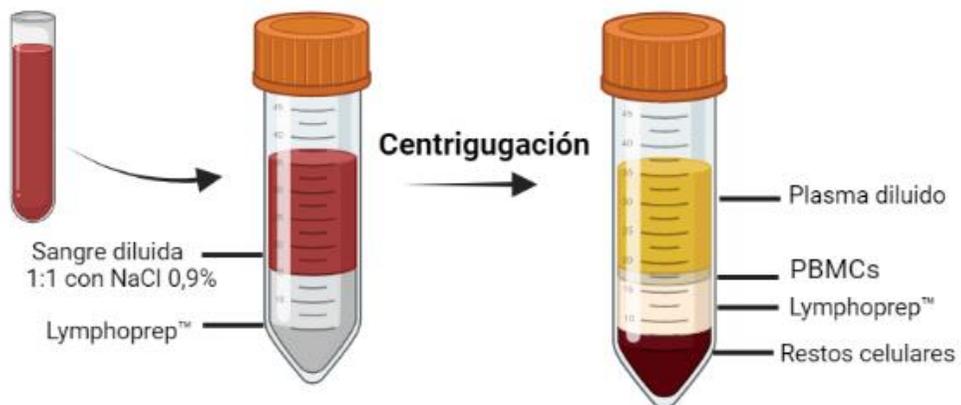


Figura 19. Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por gradiente de densidad mediante Lymphoprep™.

## Materiales y métodos

### Procedimiento:

La sangre total se mezcla con NaCl 0,9%, previamente esterilizado, en una proporción 1:1 en un tubo estéril de 50 mL, y se homogeniza lentamente la mezcla por inversión.

En un tubo estéril de 15 ml se añaden 3 ml de Lymphoprep™, y después se añade lentamente 6 mL de la mezcla sangre-NaCl. Centrifugamos los tubos a 800 g durante 30 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga con rotor basculante, sin freno ni aceleración.

Una vez finalizada la primera centrifuga, recogemos el plasma de la parte superior y lo almacenamos en alícuotas de 5 ml a -80°C.

Recuperamos los halos de PBMC y los transferimos a un tubo de 50 mL, llevando el volumen a 45 mL con PBS (Biowest; Newry y Mourne, Reino Unido). Centrifugamos a 1.300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, con el fin de lavar los restos de Lymphoprep™. El sedimento celular resultante se resuspende en 10 mL de medio RPMI (Biowest), y se transfiere a un tubo de 15 mL homogeneizando suavemente la suspensión. Para el recuento celular utilizamos 10 µL de esta suspensión y añadimos 10 µL de azul tripán (Merck Life Science S.L.U., Madrid, España) Se introducen 10 µL de esta mezcla en una cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Marienfeld Superior; Lauda-Königshofen, Alemania) y realizamos el recuento celular en un microscopio invertido de contraste de fases Leica DM IL LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Se contabiliza el número de células vivas (no teñidas por el azul tripán) en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer 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 calculado el número total de PBMC en la muestra separamos el volumen de suspensión correspondiente a 3 millones de PBMC para el estudio de subpoblaciones de linfocitos T *helper* en sangre total por citometría de flujo (ver apartado 12.2). El resto de suspensión se centrifuga a 500 g durante 4 minutos, a temperatura ambiente.

En caso de que el sedimento presente una coloración rojiza, indicadora de la presencia de eritrocitos, realizamos un lisado de eritrocitos, suspendiendo el sedimento celular en 2 mL de BD PharmLyse™ Lysing Buffer (BD Biosciences) dejándolo actuar durante 1 minuto en oscuridad, centrifugando posteriormente a 500 g durante 4 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, resuspendemos el sedimento en una mezcla de suero bovino fetal (SBF) inactivado (Gibco; Waltham, Estado Unidos) y 10% de DMSO (Merck Life Science S.L.U.) teniendo en cuenta el volumen necesario para poner una cantidad de 5 millones de células por mililitro. Repartimos el volumen de esta suspensión en criotubos (1 mL por criotubo) y se introducen inmediatamente en un recipiente *Mr. Frosty* (Nalgene; Thermo Fischer Scientific, Waltham, Estado Unidos), que contiene isopropanol para la criopreservación y se congela a -80°C. 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.

## 8 Análisis del contenido de proteínas mediante la técnica de *Western blot*

El *western blot* o inmuno blot es una técnica bioquímica que permite detectar una determinada proteína en una mezcla de proteínas, mediante el reconocimiento por parte de anticuerpos específicos. Para facilitar el reconocimiento, primero se separa la mezcla de proteínas en base a su tamaño (o peso molecular) utilizando un gel de poliacrilamida. Luego, las proteínas se transfieren a un soporte, que es común a una membrana de nitrocelulosa, donde, mediante la incubación con anticuerpos específicos, se realiza el reconocimiento y cuantificación real de las proteínas.

### **Procedimiento:**

Previamente se mide la concentración de proteína en la muestra utiliza el método BCA (*BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific). Este método consiste en la mezcla de

## Materiales y métodos

dos reactivos: reactivo A y B, mezclados en proporción 50:1 respectivamente. Incubamos 200  $\mu\text{L}$  de esta mezcla con 20  $\mu\text{L}$  de muestra durante 30 minutos a 37°C. Se obtiene una reacción colorimétrica que será proporcional a la concentración de la proteína en la muestra. Medimos la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific) y calculamos la concentración de proteína en cada fracción interpolando los valores de absorbancia de las muestras en una curva patrón de concentraciones conocidas de proteína, expresados en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Las proteínas de la muestra se separan mediante electroforesis en gel al aplicar sobre él una corriente eléctrica. Los geles constan de dos zonas: el *stacking* (Tabla 5), que concentra las muestras antes de que entren en la zona *separating* (Tabla 5), zona en la cual se separan las proteínas en base a su tamaño (kDa). El gel *separating* generalmente es un gel de poliacrilamida y la concentración de acrilamida varía en función del tamaño de las proteínas a analizar: cuanto mayor sea la concentración, mejor será la resolución de las proteínas de bajo peso molecular. En nuestro caso se utilizaron geles del 8 al 12% de acrilamida.

Previamente a ser cargadas las muestras diluidas en tampón de carga se hirvieron 5 minutos a 95°C. Después cargamos el gel, el primer carril generalmente se reservó para el marcador de peso molecular *Full-range Amersham Rainbow Marker* (GE Healthcare; Chicago, Illinois, Estados Unidos) una mezcla comercial de proteínas de peso molecular conocido, típicamente coloreadas para formar bandas de colores visibles que permiten identificar en qué zona se encuentran las proteínas de interés. Seguimos cargando en cada carril del gel la misma cantidad de proteína de cada muestra homogenizada en tampón de carga 2X (Tabla 5). Aplicando una intensidad de la corriente de 25 mA a lo largo del gel, las proteínas migran a través de él a diferentes velocidades, dependiendo de su tamaño. Estas diferentes velocidades de avance (movilidad electroforética) permiten la separación en bandas dentro de cada carril.

Para que las proteínas sean accesibles para la detección de anticuerpos, se transfieren del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con una corriente de 400 mA inmerso en un tampón de transferencia (Tabla 5). Las proteínas se mueven del gel a la membrana manteniendo la organización presente en el gel.

Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon con una solución enriquecida en albúmina de suero bovino (BSA, del inglés, *Bovine Serum Albumin*) (Merck Life Science S.L.U.) al 5% en TBS-Tween durante 1 hora. Esto permite, cuando se añade el anticuerpo, que no se una a sitios no específicos ya que están ocupados por la proteína mencionada anteriormente. Esto reduce el "ruido" en el producto final, lo que genera resultados más limpios y elimina los falsos positivos. Una vez bloqueada la membrana, la lavamos 3 veces con TBS-Tween. Después del bloqueo, las membranas se cortaron en horizontal, separando diferentes proteínas en diferentes secciones de las membranas según su tamaño. Cada sección se incubó con una solución de anticuerpos primarios específicos agitándola suavemente. Los anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo y se incubaron con las secciones de membrana durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios y diluciones utilizadas se muestran en la Tabla 5.

Tras la incubación lavamos las membranas y las incubamos con el anticuerpo secundario durante 1 hora. Lavamos 3 veces las membranas con TBS-Tween (Tabla 5) y un último lavado con tampón sustrato (Tabla 5). Revelamos las membranas sumergiéndolas en solución de revelado (Tabla 5). Esta solución reacciona con la fosfatasa alcalina del anticuerpo secundario, creando un precipitado de color morado donde se encuentra la proteína de interés. La intensidad del color de la banda es proporcional a la cantidad de proteína presente en la banda. El tiempo de revelado depende de la proteína analizada y se detiene la reacción de revelado introduciendo las membranas en agua destilada.

Para cuantificar las bandas se escanearon las membranas y la intensidad de las bandas se cuantificó con el programa AlphaImager 2200 (AlphaEase FC 2200 para Windows, Cambridge, UK). En cada muestra la expresión proteica se calculó como el incremento en porcentaje respecto a la media de la expresión del grupo control.

## Materiales y métodos

**Tabla 5. Composición de las diferentes soluciones utilizadas en la separación y cuantificación de proteínas mediante *western blot*.**

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

## 9 Aislamiento y activación de linfocitos T CD4+ in vitro a partir de PBMC congelada

### 9.1 Aislamiento de linfocitos T CD4+

Partimos de PBMC congelada en nitrógeno líquido para el aislamiento de linfocitos *T helper*, CD4<sup>+</sup>. Se descongelan las células en un baño a 37°C y se lavan con bastante medio RPMI, previamente calentado a 37°C, para eliminar el DMSO. Se recomienda realizar este paso lo antes posible, para evitar que el DMSO permanezca demasiado tiempo en contacto con las células a temperatura ambiente, provocando la muerte celular.

El aislamiento de linfocitos *T helper* se realiza con el kit comercial *EasySep™ Human CD4+ T Cell Isolation Kit* (StemCell; Vancouver, Canadá) de selección negativa.

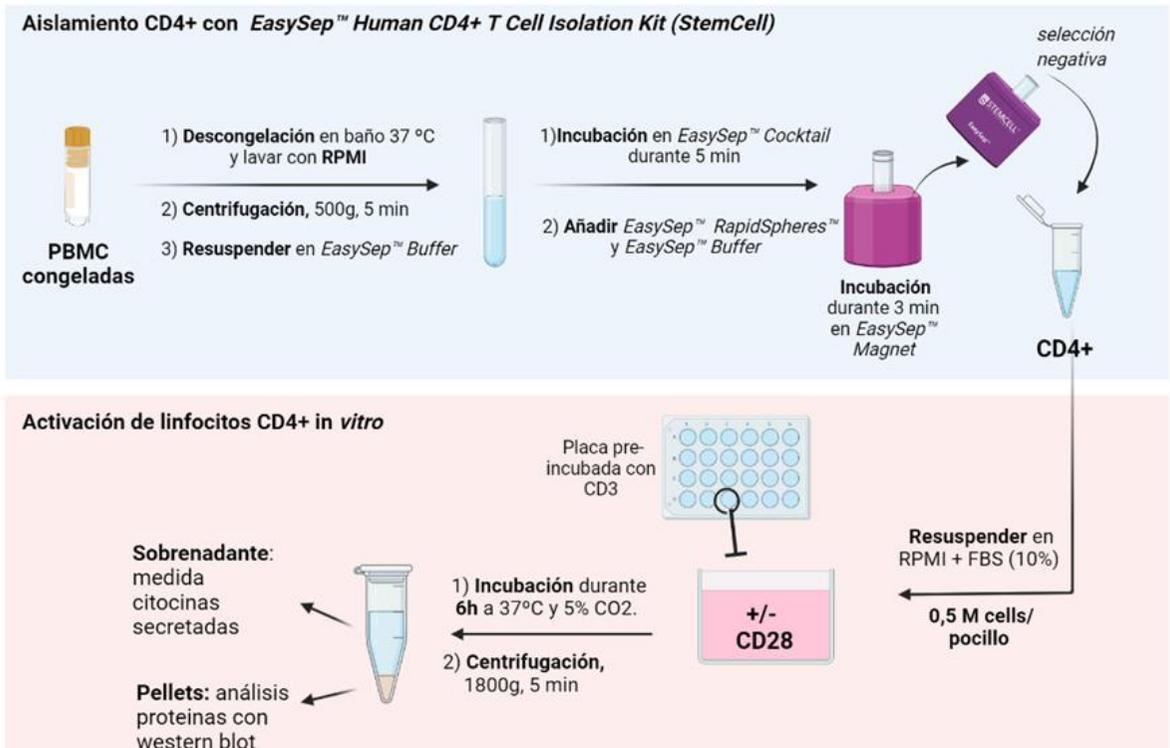


Figura 20. Esquema general del aislamiento y activación de linfocitos CD4+ in vitro a partir de PBMC congelados.

### Procedimiento:

Para iniciar el aislamiento se centrifugan las células PBMC, resuspendidas en RPMI, durante 5 minutos a 500 g y se resuspende en *EasySep™ Buffer* (StemCell). Se transfiere esta suspensión a un tubo de poliestireno y se incuba con *EasySep™ Human T Cell Isolation Cocktail*, una mezcla de anticuerpos (50 µL por mL de muestra) que permite la unión de todas las células presentes en el conjunto de PBMC a excepción de los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Después de 5 minutos de incubación, se añaden las esferas magnéticas, *EasySep™ Dextran Rapid Spheres™*, (50 µL por mL de muestra), que se unirán a estos anticuerpos. Se añade *EasySep™ Buffer* hasta llegar a un volumen de 2,5 mL y se incuba durante 3 minutos dentro de un imán *EasySep™ Magnet* (StemCell). Pasados estos minutos los linfocitos T helper quedan en suspensión y el resto de las células se quedarán retenidas en la pared del

## **Materiales y métodos**

vial. Transferimos la suspensión a un nuevo tubo por inversión sin retirar el tubo original del imán (Figura 20).

### **9.2 Cultivos celulares y activación de linfocitos T CD4+ in vitro**

Tras aislar las células CD4<sup>+</sup>, las contamos en la cámara Neubauer, como se ha descrito en el apartado 7, se centrifugan durante 5 minutos a 500 g y se resuspenden a una concentración de 1 millón de células por mililitro en medio *X-VIVO*<sup>TM</sup> 20 *Serum-Free* (Lonza; Basilea, Suiza) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina. Para activar las células se añade el anticuerpo anti-CD28 (BD Pharmingen; Franklin Lakes, New Jersey, Estados Unidos) a una concentración de 1 µg/ml.

#### **Procedimiento:**

Las células se siembran en placas de 48 pocillos tapizados previamente con el anticuerpo anti-CD3 (BD Pharmingen) durante toda la noche a 4°C (120 µL de anti-CD3 a 1 µg/ML en PBS por pocillo). En los pocillos más externos de la placa se añaden 300µL de agua/PBS para crear una cámara húmeda. El día siguiente sembramos 500.000 de células activadas con el anticuerpo anti-CD28 por pocillo y las incubamos durante 6h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Como control sin activación también sembramos varios pocillos con la misma cantidad de células CD4<sup>+</sup> en ausencia del anticuerpo CD28 en el medio y se incuban durante 6h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Tras la incubación, se recoge todo el pocillo, previamente homogeneizado, y se centrifuga 5 minutos a 1.800 g a temperatura ambiente, para obtener el pellet celular que se utiliza para el análisis del contenido proteico mediante *western blot* (ver apartado 13). El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo que utilizamos para medirlas citocinas que hayan sido secretadas al medio. Se guardan todas las muestras a -80 °C hasta su utilización (Figura 20).

## 10 Determinación de los niveles de factores inflamatorios en plasma y en medio de cultivo

### 10.1 Medida de citocinas en plasma y medio de cultivo mediante ELISA

Las citocinas presentes en el plasma y en medio de cultivo se midieron mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), con kits comerciales *DuoSet® ELISA Kits* (R&D Systems; Mineapolis, Estados Unidos) (Tabla 6) o Kits ELISA comerciales (Tabla 7) según la citocina de interés.

A continuación, se detalla el protocolo general de cuantificación mediante kits ELISA *DuoSet®* teniendo en cuenta que cada kit puede tener sus variaciones en el mismo.

#### **Procedimiento:**

Se tapiza previamente una placa de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal específico para la citocina de interés (*anticuerpo de captura*) diluido en PBS y lo dejamos incubar toda la noche a 4°C.

El primer paso es el *Bloqueo*: bloqueamos la superficie de los pocillos con una solución de BSA al 1%, se incuba durante 1 hora en agitación, a temperatura ambiente. El objetivo de este paso es evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Durante el tiempo que dura el bloqueo preparamos la curva estándar con concentraciones conocidas de la citocina de interés, y si el protocolo lo requiere, las diluciones apropiadas de las muestras. Después de la hora de incubación, se lava la placa con un tampón de lavado para eliminar la solución de bloqueo, se añaden las muestras y las diferentes diluciones de la curva y se incuba durante 2 horas en agitación, a temperatura ambiente. En este paso las moléculas de intereses presentes en las muestras o en la curva se unen al *anticuerpo de captura* pegado a la placa.

## Materiales y métodos

Transcurridas las 2 horas de 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 el anticuerpo de detección. Se incuba durante 2 horas con el anticuerpo de detección en agitación a temperatura ambiente para que el anticuerpo de detección se una al complejo anticuerpo de captura-citocina.

Se lava la placa con tampón de lavado y se añade estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano, que se unirá al complejo *anticuerpo de captura-citocina-anticuerpo de detección*. Se incuba durante una media hora en agitación y en oscuridad. Después de varios lavados se añade el sustrato, una mezcla de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y tetrametilbencidina. La peroxidasa oxida a la tetrametilbencidina y se produce un compuesto de color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de citocina presente en los pocillos. Finalmente, se para la reacción añadiendo ácido sulfúrico 2 N, virando el color de la reacción de azul a amarillo. Se lee la absorbancia de los pocillos a 450 nm en un lector de placas (Multiskan Ascent, ThermoFisher Scientific). La concentración de citocina en cada muestra se calcula a partir de los valores de absorbancia de una curva patrón con concentraciones conocidas de citocina, y se expresa en pg/mL.

En el caso de citocinas que no se detectan por estar a muy baja concentración en las muestras después de la incubación con la estreptavidina y los lavados antes del sustrato, se añade un paso de amplificación de señal. Este paso se realiza con el kit *ELAST® ELISA Amplification System* (Perkin Elmer; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para realizar este paso de amplificación de la señal, una vez lavada la placa tras la incubación con la estreptavidina se añade una solución de biotil-tiamida, que se une al complejo *anticuerpo de captura-citocina-anticuerpo de detección*. Se lava y se añade otra vez estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano. Con este paso se consigue un aumento del número de moléculas de peroxidasa por cada molécula de citocina unida, amplificándose la señal.

Después de este paso, se añade la solución de sustrato y se continúa el protocolo hasta obtener las absorbancias de cada muestra.

Se utilizaron los kits comerciales *DuoSet®* (R&D Systems) que se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Kits ELISA DuoSet® (R&D Systems) utilizados en este estudio.**

<b>Citocina</b>	<b>Nombre del kit</b>	<b>Referencia</b>
<b>IL-18</b>	Human IL-18 DuoSet ELISA	DY318-05
<b>IL-10</b>	Human IL-10 DuoSet ELISA	DY217B-05
<b>IL-23</b>	Human IL-23 DuoSet ELISA	DY1290-05
<b>IL-21</b>	Human IL-21 DuoSet ELISA	DY8879-05
<b>CCL20</b>	Human CCL20/MIP-3 alpha DuoSet ELISA	DY360-05
<b>IL-4</b>	Human IL-4 DuoSet ELISA	DY204-05
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA	DY240-05
<b>IL-22</b>	Human IL-22 DuoSet ELISA	DY782-05
<b>CX3CL1</b>	Human CX3CL1/Fractalkine DuoSet ELISA	DY365
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA	DY201-05
<b>BDNF</b>	Human/Mouse BDNF DuoSet ELISA	DY248
<b>CCL2</b>	Human CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA	DY479-05
<b>CCL5</b>	Human CCL5/RANTES DuoSet ELISA	DY278-05
<b>IL-8</b>	Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA	DY208-05

Para la medida de IL-6, IL13 y HMGB1 se utilizaron otros kits comerciales, siguiendo el protocolo correspondiente a cada uno de ellos (Tabla 7).

**Tabla 7. Kits ELISA comerciales utilizados para la determinación de IL13 e IL-6.**

<b>Citocina</b>	<b>Nombre del kit</b>	<b>Referencia</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>IL-13</b>	Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA	BMS231-3	Invitrogen
<b>IL-6</b>	Human IL-6 Quantikine HS ELISA	HS600C	R&D Systems

Para la determinación de las citocinas IL-17A; IL-12-p70; IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , recurrimos a la tecnología ultrasensible de matriz de molécula única Simoa™, del inglés *Single Molecule Arrays*, (Quanterix, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). Esta técnica proporciona una mayor sensibilidad que el ELISA convencional. Se utilizó el kit Cytokine 6-Plex Panel 1 (IFN $\gamma$ , IL-6, IL10, IL-12p70, IL-17A, TNF- $\alpha$ ) (ref. 102958; Quanterix) mediante un equipo

## **Materiales y métodos**

SIMOA SR-X de la Unidad de Neuroinmunología Clínica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

Medidas adicionales de la interleucina IL-17A se realizaron mediante tecnología Simoa™ con el kit *IL-17A 2.0 Advantage Assay* (ref. 101599; Quanterix, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) en el equipo SIMOA HD-X (Quanterix) del INCLIVA de Valencia.

### **10.2 Determinación de los niveles de interleucina IL-21 en linfocitos T CD4+**

La cuantificación de los niveles de IL-21 en los sedimentos celulares obtenidos a partir de los cultivos de células CD4<sup>+</sup> se realizó mediante la técnica de *Western Blot* (ver apartado 13).

El procesamiento previo de las muestras celulares se realizó como sigue: Se resuspendieron las células en 1 mL de PBS y se centrifugaron a 2500g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 50 µL del tampón de extracción y lisis RIPA (Thermo Fisher Scientific), añadiéndole Mini-pastillas inhibidoras de proteasas y fosfatasas Pierce™ sin EDTA (Thermo Fisher Scientific). La eficacia de la lisis celular se obtiene sonicando las muestras con 3 pulsos de 10 segundos al 30%, en hielo con el sonicador Branson Sonifier SFX 150. Se centrifugaron durante 15 minutos a 14.000 g a 4°C, y en el sobrenadante se midió la concentración de proteína por el método BCA (ver apartado 8).

Para la determinación de IL-21 en las muestras cargamos el volumen correspondiente a 10 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 12%. (ver apartado 8). Utilizamos el anticuerpo primario anti IL-21, de conejo (Abcam, ref. ab5978) a una dilución de 1:1500. El anticuerpo secundario,  $\alpha$ -rbb, conjugado a fosfatasa alcalina y la dilución utilizada fue de 1:4000 (Merck Life Science S.L.U.)

### 10.3 Medida de Inmunoglobulina G (IgG) en plasma por *Western Blot*

Los niveles de Inmunoglobulina G (IgG) se determinaron en plasma mediante la técnica de *western blot* (ver apartado 8). Una vez cuantificada la concentración de proteínas en plasma por el método BCA (ver apartado 8), se cargó un volumen correspondiente a 80 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 12%. Utilizamos el anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina, monoclonal de ratón, (ref. A2064; Merck Life Science S.L.U.) a una dilución de 1:80000.

## 11 Medida de la expresión de factores de transcripción y receptores

### 11.1 Aislamiento del ARN total a partir de PBMC

Para el aislamiento del ARN total de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), utilizamos el kit de extracción RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare). El protocolo consiste en una serie de purificaciones en columna. En primer lugar, las células se lisan mediante incubación en una solución, *Lysis Solution*, que inactiva inmediatamente las RNAsas, que están presentes en prácticamente todas las muestras biológicas. Se realizó la digestión del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico mediante una enzima desoxirribonucleasa (*DNase I Solution*), seguida de dos sencillos pasos de lavado con dos tampones diferentes que eliminan las sales, los metabolitos y los componentes celulares macromoleculares. Finalmente, el ARN puro se eluyó con 30 µl de agua libre de RNasa.

La concentración y pureza del ARN se determinó mediante Nanodrop ND-2000 (Nanodrop, LabTech International; Hopkinton, Massachusetts, Estados Unidos), utilizando 2 µL de muestra. La pureza del ARN se comprobó con la ratio  $\lambda=260 \text{ nm}/\lambda=280 \text{ nm}$ . Un ARN se considera de buena calidad cuando este valor está comprendido entre 1,8 y 2.

## Materiales y métodos

### 11.2 Retrotranscripción del ARN

La reacción de retrotranscripción es la capacidad de determinadas enzimas para sintetizar una molécula de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN. La enzima responsable de esta reacción es la enzima retrotranscriptasa. La reacción se realizó a partir de 1 µg de ARN y seguimos el protocolo del kit *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Applied Biosystems; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems).

Las condiciones de la retrotranscripción fueron: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C manteniendo la muestra a 4°C hasta ser almacenada a -80°C.

### 11.3 PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa, en inglés *quantitative PCR* (qPCR), es una reacción de polimerización en cadena en la que el ADNc no sólo se amplifica, sino que también se cuantifica. Normalmente se utilizan intercaladores fluorescentes, es decir, moléculas que se unen al ADN o sondas de oligonucleótidos que, al estar marcadas con fluoróforos, emiten una señal de luz fluorescente cada vez que se hibridan con el ADN. La fluorescencia de cada reacción será proporcional a la cantidad de ARN mensajero de interés presente en la muestra de ARN.

Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos (Applied Biosystems). La expresión de cada gen analizado la cuantificamos en relación con la expresión de un control endógeno de expresión constitutiva (*housekeeping*). Para nuestro análisis utilizamos el gen HPRT1 (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*).

Los reactivos utilizados fueron *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) y sondas Taqman™ (Applied Biosystems), conjugadas al fluoróforo FAM™ (Tabla 8 y Tabla9).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems), y las condiciones 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.

Para determinar los niveles de expresión relativa de cada gen con respecto al gen endógeno (HPRT1) (*fold change*), en los pacientes sin o con deterioro cognitivo, realizamos los cálculos tomando como referencia el grupo control.

Tras realizar la qPCR se obtienen valores de  $C_T$  (del inglés *Cycle threshold*), que indican el número de ciclos necesarios para detectar la señal fluorescente en cada reacción. Calculamos la  $\Delta C_T$  restando la  $C_T$  de la muestra de interés menos la  $C_T$  del control endógeno (HPRT1). Después calculamos el  $\Delta\Delta C_T$ , que es igual a la diferencia entre la  $\Delta C_T$  de cada muestra y la media de  $\Delta C_T$  del grupo control. Finalmente calculamos el *fold change*, que será:  $2^{\exp(-\Delta\Delta C_T)}$ .

De esa manera el grupo control debería presentar valores de *fold change* igual a 1, mientras que valores menores o mayores a 1 indican una menor o mayor expresión de las muestras de los pacientes respecto al grupo control.

En las Tablas 8 y 9 se muestran las sondas Taqman™ utilizadas para medir los niveles de expresión de los genes de interés.

**Tabla 8. Sondas Taqman™ utilizadas para el estudio de factores de transcripción específicos de varias subpoblaciones de linfocitos T y receptores.**

<i>Población Linfocitos T</i>	<b>Gen</b>	<i>Referencia</i>
<b>Housekeeping</b>	<b>HPRT1</b>	Hs02800695_m1
<b>Th1</b>	<b>TBX21</b>	Hs00203436_m1
<b>Th2</b>	<b>GATA3</b>	Hs00231122_m1
<b>Tregs</b>	<b>FOXP3</b>	Hs01085834_m1
<b>Th17</b>	<b>RORC</b>	Hs01076122_m1
<b>Th22</b>	<b>AHR</b>	Hs00907314_m1
<b>Th follicular</b>	<b>BCL6</b>	Hs00153368_m1

## Materiales y métodos

**Tabla 9. Sondas Taqman™ utilizadas para el análisis génica de los receptores de interés.**

<b>Gen</b>	<i>Referencia</i>
<b>HPRT1</b>	Hs02800695_m1
<b>CCR2</b>	Hs00704702_s1
<b>TLR2</b>	Hs01872448_s1
<b>TLR4</b>	Hs00152939_m1

## 12 Análisis de poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición de múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad. Las células se unen a anticuerpos específicos, marcados con un fluorocromo, capaces de reconocer una determinada molécula diana en la superficie o en el interior de la célula.

En el citómetro de flujo, las células, en suspensión, pasan a través de un tubo de manera individual, una a la vez, y se iluminan con un láser. Cuando el láser incide en una célula, una fracción de la luz es dispersada y produce una señal. Un dispositivo de detección óptico recoge la señal producida, caracterizando cada célula por su tamaño, volumen celular (FS, del inglés *forward scatter*), su morfología, granulosis (SS, del inglés *side scatter*) y la fluorescencia de los fluorocromos.

Para estos análisis utilizamos el citómetro *Gallios flow cytometer* (Beckman Coulter; Miami, Florida, Estados Unidos) del Servicio de Citómica de la Universidad de Valencia. Los datos se analizaron mediante el software *Kaluza Analysis Software* (Beckman Coulter).

## 12.1 Estudio cuantitativo de las poblaciones leucocitarias en sangre total

Para el estudio general de las poblaciones leucocitarias partimos de 50  $\mu$ L de sangre con EDTA a los que se añadieron diferentes anticuerpos según las poblaciones leucocitarias a analizar (Tabla 10).

**Tabla 10. Anticuerpos utilizados para el análisis de poblaciones leucocitarias por citometría de flujo.**

<i>ANTICUERPO</i>	<i>FLUORÓFORO</i>	<i>CASA COMERCIAL</i>
<b>CD45</b>	KO	Beckman Coulter
<b>CD14</b>	PB	Biolegend
<b>CD16</b>	APC	Beckman Coulter
<b>CD19</b>	APC AlexaFluor700	Beckman Coulter
<b>CD3</b>	APC	Biolegend
<b>CD4</b>	ECD	Beckman Coulter
<b>CD8</b>	PE/Cy7	Beckman Coulter
<b>CD56</b>	PE	Immunostep

KO (Krome Orange); PB (Pacific Blue); APC Alexa Fluor 700(Allophycocyanin Alexa Fluor 700); ECD (Electron Coupled Dye); PE/Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 7); PE (Phycoerythrin)

Se lisaron los eritrocitos con 2 mL de BD FACS Lysing Solution 1x (BD Biosciences) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, para cuantificarlas se añadieron 50  $\mu$ L de *Flow Count* (Beckman Coulter), y medimos en citómetro.

Mediante la combinación de anticuerpos de la Tabla 10 se identificaron los leucocitos por morfología y por ser positivos para CD45, y se subdividió esta población en:

- Monocitos: se marcan específicamente con CD14 y CD16, dentro de la población de leucocitos (CD45<sup>+</sup>)
- Linfocitos T: marcados con CD3 dentro de la población de leucocitos (CD45<sup>+</sup>)

## Materiales y métodos

- Linfocitos T CD4: son células CD4<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>)
- Linfocitos T CD8: son células CD8<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>)
- Natural Killers (NK): marcados con CD56 dentro de población de leucocitos (CD45<sup>+</sup>)
- Linfocitos B: son células CD19<sup>+</sup> dentro de población de leucocitos (CD45<sup>+</sup>)

Finalmente, se enfrenta cada población identificada al marcador de activación temprana CD69, que nos indica el porcentaje de células activadas en cada población.

### 12.1.1 Análisis de poblaciones de monocitos

Para el estudio de monocitos en sangre total partimos de la misma cantidad de muestra (50 µl de sangre EDTA) y se le añaden los anticuerpos que se indican en la Tabla 11.

**Tabla 11. Anticuerpos utilizados para el análisis de poblaciones monocitos por citometría de flujo.**

<i>ANTICUERPO</i>	<i>FLUORÓFORO</i>	<i>CASA COMERCIAL</i>
<b>CD45</b>	KO	Beckman Coulter
<b>CD14</b>	PB	Biologend
<b>CD16</b>	APC	Beckman Coulter
<b>CD56</b>	PE	Immunostep

KO (Krome Orange); PB (Pacific Blue); APC(Allophycocyanin); PE (Phycoerythrin)

Procedemos con el mismo protocolo explicado en el apartado 12.1. Mediante la combinación de los anticuerpos de Tabla 11, identificamos los monocitos por morfología dentro de la población de células CD45<sup>+</sup> y eliminamos también la población de las NK identificándolas con el CD56.

Según van perdiendo CD14 y adquiriendo CD16, analizamos los tres diferentes estadios:

- Monocitos clásicos: CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>
- Monocitos intermedios: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>
- Monocitos no-clasicos: CD14<sup>-</sup>CD16<sup>++</sup>

### 12.1.2 Estudio de linfocitos B

Para el estudio de subpoblaciones de linfocitos B partimos de 100  $\mu$ L de sangre total con EDTA en un tubo de citometría e incubamos durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con los anticuerpos que se relacionan en la Tabla 12.

**Tabla 12. Anticuerpos utilizados para el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B por citometría de flujo.**

<i>ANTICUERPO</i>	<i>FLUORÓFORO</i>	<i>CASA COMERCIAL</i>
<b>CD45</b>	KO	Beckman Coulter
<b>CD19</b>	ECD	Beckman Coulter
<b>CD27</b>	PE/Cy7	Biolegend
<b>CD38</b>	APC/Fire™750	Biolegend
<b>IgM</b>	PB	Beckman Coulter
<b>IgD</b>	FITC	Biolegend
<b>CD69</b>	PE	Biolegend

KO (Krome Orange); ECD Electron Coupled Dye); PE/CY7 (Phycoerythrin-Cyanine7); APC/Fire™750 (Allophycocyanin Fire™750); PB (Pacific Blue); FITC (Fluorescein IsoTioCyanate); PE (Phycoerythrin).

Después lavamos la muestra con 3 mL de PBS, y centrifugamos durante 5 minutos a 1.000 g; este paso se repitió dos veces. Tras el último lavado se resuspendió la muestra en 100  $\mu$ L de PBS. Añadimos 2mL de *BD FACS Lysing Solution* 1x (BD Biosciences), e incubamos 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras los minutos de incubación centrifugamos a 200 g, 5 minutos y resuspendimos en 300  $\mu$ L de PBS. Para el recuento total de cada población añadimos 100  $\mu$ L de *Flow Count* (Beckman Coulter), y se pasó la muestra por el citómetro.

Discriminamos los linfocitos B por morfología y por ser positivos a CD45. Los linfocitos B son positivos para el marcador CD19, y dentro de ellos se identificaron diferentes subpoblaciones de interés (Tabla 13):

## Materiales y métodos

- Plasmoblastos: células  $CD27^{high}/CD38^{+}$  dentro de la población de linfocitos B ( $CD19^{+}$ )
- Linfocitos B inmaduros: células  $CD27^{-}/CD38^{+}$  dentro de la población de linfocitos B ( $CD19^{+}$ )
- Linfocitos B transicionales: células  $CD27^{-}/CD38^{+}/IgM^{high}/IgD^{+}$  dentro de la población de linfocitos B ( $CD19^{+}$ )
- Linfocitos B maduros: células  $CD38^{-}$  dentro de la población de linfocitos B ( $CD19^{+}$ )
- Linfocitos B *naïve*: células  $IgD^{+}/CD27^{-}$  dentro de la población de linfocitos B maduros ( $CD19^{+}/CD38^{-}$ )
- Linfocitos B memoria: células  $CD27^{+}$  dentro de la población de linfocitos B maduros ( $CD19^{+}/CD38^{-}$ )
- Linfocitos B *unswitched*: células  $IgM^{+}/IgD^{+}$  dentro de la población de linfocitos B memoria ( $CD19^{+}/CD38^{-}/CD27^{+}$ )
- Linfocitos B *switched*: células  $IgM^{-}/IgD^{-}$  dentro de la población de linfocitos B memoria ( $CD19^{+}/CD38^{-}/CD27^{+}$ )
- Linfocitos B *switched* doble negativo: células  $CD27^{-}/IgM^{-}/IgD^{-}$  dentro de la población de linfocitos B memoria ( $CD19^{+}/CD38^{-}/CD27^{+}$ )

Una vez identificada cada población, el porcentaje de las células activadas se analizó enfrentando las células al marcador de activación temprana CD69.

En la Figura 21 se presenta un ejemplo de los pasos en el estudio de subpoblaciones de linfocitos B en sangre total mediante el software Kaluza (Beckman Coulter).

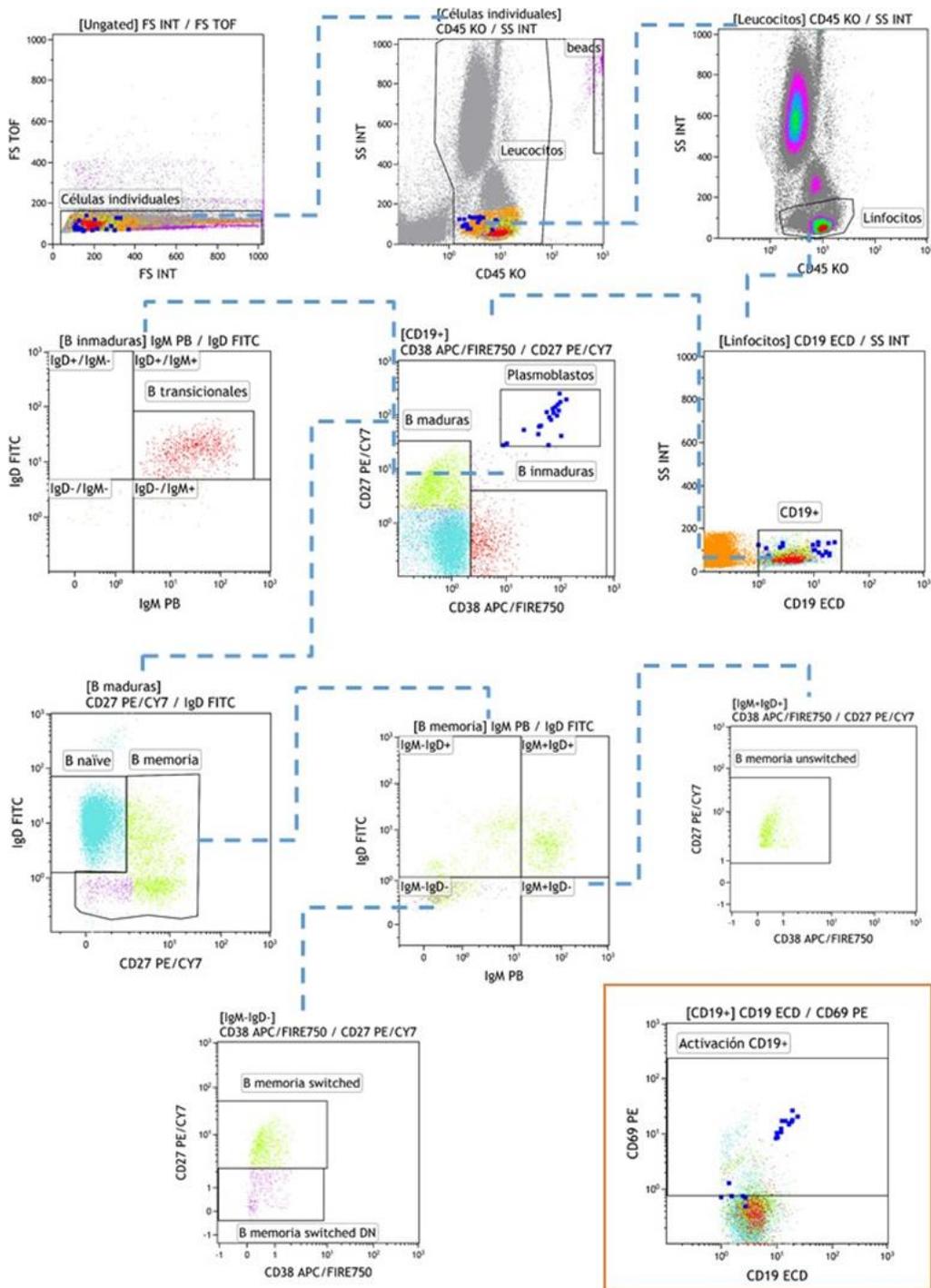


Figura 21. Ejemplo de pasos en el estudio de subpoblaciones de linfocitos B mediante citometría de flujo.

## Materiales y métodos

**Tabla 13. Poblaciones de linfocitos B analizadas por citometría de flujo y los diferentes marcadores utilizados**

<b>Población</b>	<b>CD45</b>	<b>CD19</b>	<b>CD27</b>	<b>CD38</b>	<b>IgD</b>	<b>IgM</b>	<b>CD69</b>
<i>Linfocitos B</i>	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>Plasmoblastos</i>	+	+	++	+	-	-	+/-
<i>Linfocitos B inmaduros</i>	+	+	-	+	-	-	+/-
<i>Linfocitos B transicionales</i>	+	+	-	+	+	+	+/-
<i>Linfocitos B maduros</i>	+	+	+/-	-	-	-	+/-
<i>Linfocitos B naïve</i>	+	+	-	-	+	-	+/-
<i>Linfocitos B memoria</i>	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-
<i>Linfocitos B unswitched</i>	+	+	+	-	+	+	+/-
<i>Linfocitos B switched</i>	+	+	+	-	-	-	+/-
<i>Linfocitos B switched doble negativo</i>	+	+	+/-	-	-	-	+/-

### 12.2 Estudio de subpoblaciones de linfocitos T

Se analizaron diversas poblaciones de linfocitos T en sangre total mediante citometría de flujo: linfocitos T *naïve*, de memoria y auto-reactivos.

Dentro de la población de linfocitos T *helper* analizamos diferentes subpoblaciones: Linfocitos Th1, Th2, Th9, Th foliculares, Th22, TH17 y T reguladores. Estos análisis se realizaron partiendo de una muestra concentrada de PBMC, que permitió mejorar la detección de estas poblaciones celulares.

### 12.2.1 Estudio de subpoblaciones de linfocitos T en sangre total: linfocitos T naïve, de memoria y auto-reactivos

Para este estudio partimos de 50 µl de sangre EDTA, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 12.1.

**Tabla 14. Panel de anticuerpos utilizados para el estudio de subpoblaciones de linfocitos T en sangre total.**

<i>ANTICUERPO</i>	<i>FLUORÓFORO</i>	<i>CASA COMERCIAL</i>
<b>CD45</b>	KO	Beckman Coulter
<b>CD3</b>	APC	Biolegend
<b>CD4</b>	ECD	Beckman Coulter
<b>CD8</b>	PE/Cy7	Beckman Coulter
<b>CD45RO</b>	APC-Cy7	Biolegend
<b>CD45RA</b>	PerCP-Cyanine5.5	Biolegend
<b>CD62L</b>	FITC	Biolegend
<b>CCR7</b>	PE/Cy7	Biolegend
<b>CD28</b>	PB	Biolegend
<b>CD69</b>	Alexa flúor 488	Biolegend

KO (Krome Orange); APC (Allophycocyanin); ECD Electron Coupled Dye); PE/CY7 (Phycoerythrin-Cyanine7); FITC (Fluorescein IsoTioCyanate); PB (Pacific Blue).

Primero identificamos la población de linfocitos por morfología y por ser positivos a CD45 y distinguimos dentro de la población de los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), los linfocitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>) y los linfocitos T *citotóxicos* (CD8<sup>+</sup>).

Con las diferentes combinaciones de los anticuerpos de la Tabla 14, identificamos las siguientes poblaciones (Tabla 15):

## Materiales y métodos

- Linfocitos T de memoria: son células CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> dentro de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>
- Linfocitos T *naïve*: son células CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> dentro de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>
- Linfocitos T de memoria central (CM): son los linfocitos T CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dentro de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>
- Linfocitos T de memoria efectora (EM): son células CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> dentro de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>
- Linfocitos T auto-reactivos: son linfocitos T carentes de la molécula coestimuladora CD28 dentro de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>

Una vez identificada cada población, el porcentaje de las células activadas se analiza enfrentando las células al marcador de activación temprana CD69.

**Tabla 15. Poblaciones de linfocitos T analizadas por citometría de flujo y los diferentes marcadores utilizados**

<i>Población</i>	CD4/CD8	CD45RA	CD45RO	CD62L	CCR7	CD28	CD69
<i>Linfocitos T de memoria</i>	+	-	-	-	-	-	+/-
<i>Linfocitos T naïve</i>	+	+	-	-	-	-	+/-
<i>Linfocitos T de memoria central (CM)</i>	+	-	+	+	+	-	+/-
<i>Linfocitos T de memoria efectora (EM)</i>	+	-	+	-	-	-	+/-
<i>Linfocitos T auto-reactivos</i>	+	-	-	-	-	+/-	+/-

### 12.2.2 Estudio de los subtipos de linfocitos T helper en PBMC

Para una mejor detección, el estudio de los subtipos de linfocitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>) se realizó en muestras de PBMC aisladas (ver apartado 7). Es importante, antes de empezar el ensayo, tener en cuenta que se está partiendo de células que han llevado un procesamiento previo, y que puede existir la posibilidad de la presencia de células muertas. Para excluir las células muertas del análisis, añadimos *Zombie Violet™ Fixable Viability Kit* (Biolegend; San Diego, Estados Unidos) como marcador de viabilidad. El reactivo se diluyó en proporción 1:1.000 en PBS, se añadieron 100 µL a la muestra y se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después de este tiempo el marcador de viabilidad se une directamente a las células muertas.

### 12.2.3 Análisis de poblaciones de linfocitos Th1, Th2, Th9, Th foliculares, Th17 y Th22

Partimos de una cantidad de 300.000 PBMC, lavamos con PBS, centrifugamos durante 5 minutos a 1.000 g y se resuspende el sedimento celular en 100 µL de PBS. Después de haber añadido el marcador de viabilidad *Zombie Violet™ Fixable Viability Kit* en la proporción y cantidad descrita en el apartado 12.1, y transcurrida la media hora de incubación, la muestra se lavó con 2 mL de PBS, se centrifugó a 350 g 5 minutos y se resuspendió en 100 µL de PBS. Finalmente, incubamos durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con los anticuerpos de la Tabla 16.

## Materiales y métodos

**Tabla 16. Panel de anticuerpos utilizados para el análisis de linfocitos Th1, Th2, Th9, Th foliculares, Th22 y Th17.**

<i>ANTICUERPO</i>	<i>FLUORÓFORO</i>	<i>CASA COMERCIAL</i>
<b>CD4</b>	ECD	Beckman Coulter
<b>CXCR5</b>	Alexa Fluor 700	Biologend
<b>CXCR3</b>	VioBright FITC	Miltenyi Biotec
<b>CCR4</b>	PE Vio770	Miltenyi Biotec
<b>CCR6</b>	Brilliant Violet 510	Biologend
<b>CCR10</b>	PE	Miltenyi Biotec
<b>CD69</b>	APC Vio770	Miltenyi Biotec

ECD (Electron Coupled Dye); PE Vio770 (Phycoerythrin Vio 770); PE (Phycoerythrin); APC Vio770 (Allophycocyanin Vio 770).

Tras la tinción con los anticuerpos, lavamos dos veces con 3 mL de PBS con centrifugaciones de 1.000 g de 5 minutos cada una. Resuspendimos la muestra en 100  $\mu$ L de PBS y seguimos con la lisis con 2 mL *VersaLyse Lysing Solution* (Beckman Coulter). Fijamos la muestra con *IOTest 3 Lysing Solution* (Beckman Coulter). Incubamos 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, centrifugamos a 200 g, 5 minutos y se resuspendió el sedimento celular en 300  $\mu$ L de PBS. Para el recuento celular añadimos 100  $\mu$ L de *Flow Count* (Beckman Coulter), y pasamos la suspensión por el citómetro.

A partir de los linfocitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>) se identificaron varias poblaciones de interés (Tabla 17):

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

- Linfocitos Th17: células CXCR3<sup>-</sup>/CCR4<sup>+</sup>/ CCR6<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>).
- Linfocitos Th2: células CXCR3<sup>-</sup>/CCR4<sup>+</sup>/CCR10<sup>-</sup>/CCR6<sup>-</sup> dentro de la población de linfocitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>).

Se enfrentaron las células al marcador de activación temprana CD69, para la determinación del porcentaje de células activadas en cada población celular identificada.

**Tabla 17. Subpoblaciones de linfocitos T helper analizadas por citometría de flujo y los diferentes marcadores utilizados**

<i>Población</i>	<b>CD4</b>	<b>CXCR5</b>	<b>CXCR3</b>	<b>CCR4</b>	<b>CR10</b>	<b>CCR6</b>	<b>CD69</b>
<i>Th1</i>	+	-	+	-	-	-	+/-
<i>Th2</i>	+	-	-	+	-	-	+/-
<i>Th9</i>	+	-	-	-	-	+	+/-
<i>Th follicular</i>	+	+	-	-	-	-	+/-
<i>Th17</i>	+	-	-	+	-	+	+/-
<i>Th22</i>	+	-	-	+	+	+	+/-

# Materiales y métodos

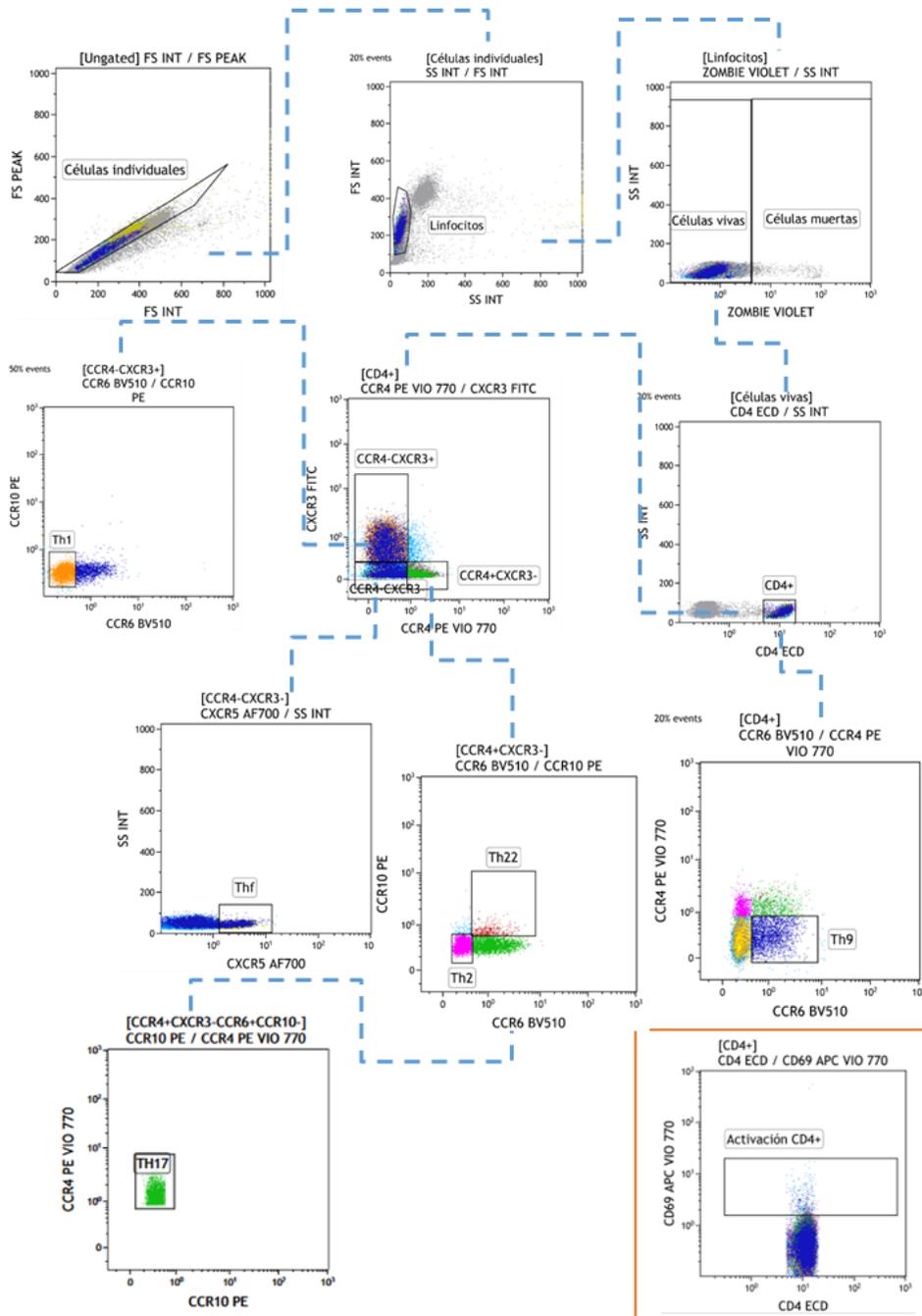


Figura 22. Ejemplo de los pasos en el estudio de subpoblaciones de linfocitos T: Th1, Th2, Th9, Thf, Th22 y Th17 mediante citometría de flujo.

En la Figura 22 se presenta un ejemplo de los pasos en el estudio de poblaciones de linfocitos Th1, Th2, Th9, Th17, Th foliculares y Th22 mediante el software Kaluza (Beckman Coulter).

### 12.2.3.1 Análisis de poblaciones de linfocitos T reguladora y Th17 intracelulares

Partimos de  $1.5 \times 10^6$  PBMC, que se centrifugaron durante 5 minutos a 1.000 g y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de PBS. Seguimos con los mismos pasos que se describen en el apartado 12.1. hasta la lisis celular con *VersaLyse Lysing Solution* (Beckman Coulter). Los anticuerpos utilizados fueron los que se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18. Panel de anticuerpos utilizados para el análisis de linfocitos Th17 y T reguladoras.**

<i>ANTICUERPO</i>	<i>FLUORÓFORO</i>	<i>CASA COMERCIAL</i>
<b>CD4</b>	ECD	Beckman Coulter
<b>CD25</b>	Brilliant Violet 510	Biolegend
<b>CD69</b>	APC Vio770	Miltenyi Biotec
<b>IL17</b>	PE	Biolegend
<b>FoxP3</b>	Alexa Fluor 480	BD Pharmingen

ECD (Electron Coupled Dye); APC Vio770 (Allophycocyanin Vio 770); PE (Phycoerythrin).

Para este estudio utilizamos marcadores presentes en la superficie celular (CD4, CD25 y CD69) y marcadores intracelulares, presentes en el interior de la célula (IL17 y FoxP3).

Para el estudio de marcadores intracelulares utilizamos el kit *Human FoxP3 Buffer Set* (BD Pharmingen), que permite la entrada de los anticuerpos en la célula, haciendo que la célula sea permeable. Después de la lisis de eritrocitos lavamos las células con 2 mL de *Stain*

## Materiales y métodos

*Buffer* (*Human FoxP3 Buffer Set*; BD Pharmingen) y centrifugamos durante 10 minutos a 250 g. Eliminamos el *Stain Buffer* y añadimos 2 mL de 1x *Human FoxP3 Buffer A* (*Human FoxP3 Buffer Set*; BD Pharmingen); incubamos la muestra 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se centrifugó a 500 g durante 5 minutos, y lavamos las células con 2 mL de *Stain Buffer*. Se centrifugó a 500 g durante 5 minutos, eliminamos el *Stain Buffer* y añadimos 500 µL de 1X *Working Solution Human FoxP3 Buffer C* (*Human FoxP3 Buffer Set*; BD Pharmingen) para permeabilizar las células. Incubamos durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Lavamos las células con 2 mL de *Stain Buffer*, centrifugamos a 500 g durante 5 minutos, resuspendimos las células con 100 µL de *Stain Buffer* del anterior lavado e incubamos durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con los anticuerpos para marcadores intracelulares, presentes en el interior de la célula (IL17 y FoxP3) (Tabla 19).

Repetimos el último lavado y resuspendimos las células con 100 µL de volumen residual de *Stain Buffer*. Para obtener el dato del recuento celular se utilizó *Flow Count* (Beckman Coulter) y pasamos la suspensión por el citómetro.

A partir de los linfocitos T *helper* se identificaron dos poblaciones de interés (Tabla 20):

- Linfocitos Th17: células IL17<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>).
- Linfocitos T reguladores: células CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>).

El estudio de activación temprana con el marcador CD69 se realizó también para estas poblaciones celulares.

**Tabla 19. Poblaciones de linfocitos Th17 y T reguladoras analizadas por citometría de flujo y los diferentes marcadores utilizados**

<b>Población</b>	<b>CD4</b>	<b>IL-17</b>	<b>CD25</b>	<b>Foxp3</b>	<b>CD69</b>
<b>Th17 (intracelular)</b>	+	+	-	-	+/-
<b>Tregs</b>	+	-	+	+	+/-

En la Figura 23 se presenta un ejemplo de los pasos en el estudio de poblaciones de linfocitos Th17 y T reguladores mediante el software Kaluza (Beckman Coulter).

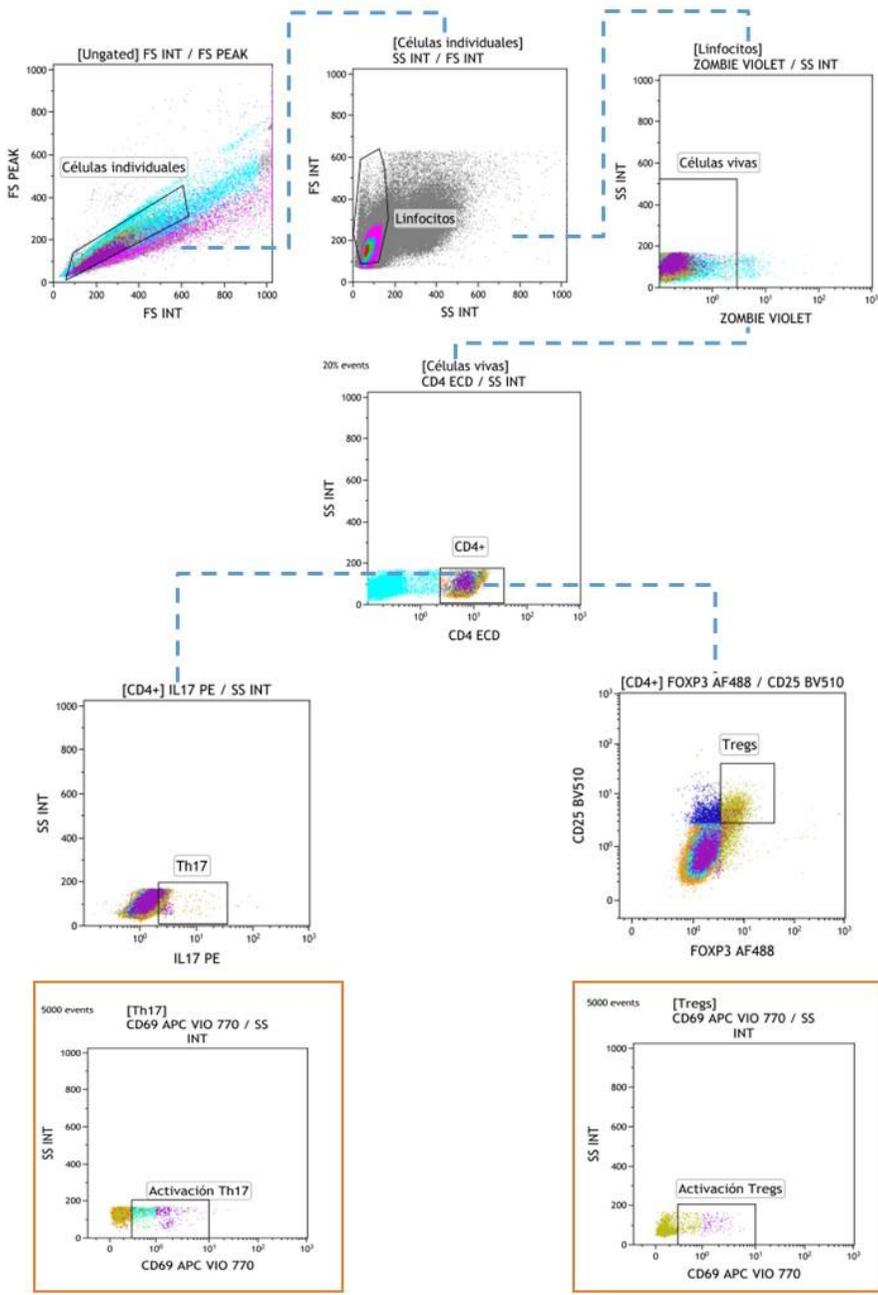


Figura 23. Ejemplo de los pasos en el estudio de subpoblaciones de linfocitos T: Th17 y Tregs mediante citometría de flujo.

### 13 Análisis estadístico

Previamente se realizó el test de normalidad Shapiro-Wilk para estudiar la distribución de las muestras para cada variable. Los resultados se presentan expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias absolutas y porcentajes (%).

Para comparar variables cualitativas se utilizó la prueba de Chi cuadrado o el test de Fisher. Para comparar variables cuantitativas se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido del test de Tukey para comparar medias por parejas dentro de los grupos de estudio, o utilizamos el test de Student cuando comparamos las medias de dos grupos entre sí. En el caso de variables no paramétricas se utilizó el test de Kruskal-Wallis seguido de test de Dunn para la comparación de más de dos grupos y la prueba de Mann-Whitney para comparaciones entre dos grupos. Se comprobó la igualdad de varianzas mediante el test de Levene.

Se realizó un análisis de correlación bivariada con el coeficiente de correlación de Spearman en el caso de variables discretas o de Pearson, en el caso de variables continuas. El intervalo de confianza es del 95%. Para analizar la capacidad diagnóstica de las variables se utilizaron las curvas COR (Característica Operativa del Receptor) con un intervalo de confianza del 95%. Además, se llevó a cabo análisis de regresión logística multivariada y univariada, teniendo como variable dependiente la presencia de DCL en el grupo de pacientes.

El análisis estadístico se realizó con los programas estadísticos GraphPad Prism versión 8.0. y SPSS versión 24.0 (SPSS Inc, Chicago, Estados Unidos) y los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

## **V. Resultados**



## 1 Estudio de la cohorte de pacientes y controles

### 1.1 Características clínicas de los pacientes con NAFLD y sujetos control

Según las puntuaciones NAS y FAST, el 55% de los pacientes se clasificaron como NAFL (n = 40), y el 45% como NASH (n = 33).

Como se muestra en la Tabla 20, no encontramos diferencias significativas entre los pacientes con NAFLD y el grupo control tanto en la edad, género y nivel de escolarización. En cuanto a los niveles de transaminasas AST y ALT los pacientes con NAFLD presentaban diferencias significativas con respecto al grupo de sujetos sanos ( $p < 0,0001$ ). Además, el IMC (índice de masa corporal) de los sujetos con NASH era significativamente mayor respecto a aquellos con NAFL ( $p < 0,014$ ).

Por último, los pacientes con NASH presentaban más fibrosis hepática con respecto a los pacientes con NAFL ( $p = 0,023$ ). (Tabla 20).

## Resultados

**Tabla 20. Características clínicas de los pacientes con NAFLD**

Parámetros	Control	Pacientes NAFL	Pacientes NASH	Valor global <i>p</i>
Número de sujetos [n (%)]	64	40 (55)	33 (45)	
Edad <sup>a</sup>	58 ± 1,0	58 ± 1,4	59 ± 1,4	0,1290
Género [n (%)]				0,828
- Hombre	34 (53)	23 (58)	12 (36)	
- Mujer	30 (47)	17 (42)	21 (64)	
Educación <sup>a,b</sup>	15 ± 1,2	15 ± 0,7	12 ± 0,7	0,2075
<b>Comorbilidades [n (%)]</b>				
- Diabetes mellitus	-	14 (36)	16 (50)	0,235
- Dislipemia	-	24 (62)	18 (56)	0,654
- Hipertensión arterial	-	18 (46)	20 (63)	0,172
- Síndrome metabólico	-	15 (39)	18 (56)	0,138
<b>Parámetros analíticos<sup>a</sup></b>				
- AST (U/L)	25,8 ± 1,2	33,31 ± 2,6	42,23 ± 4,0****	<0,0001
- ALT (U/L)	25,7 ± 1,7	42,1 ± 3,7***	51,0 ± 4,5****	<0,0001
- Albumina (g/dL)	4,4 ± 0,04	4,4 ± 0,04	4,3 ± 0,07	0,0823
- Bilirrubina (mg/dL)	0,6 ± 0,03	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,1826
- Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,02	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,2907
- Plaquetas (x10 <sup>9</sup> )	242,3 ± 9,0	249 ± 15	241 ± 15	0,8870
- INR	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,3551
- Amonio (µM)	9,9 ± 0,5	16,3 ± 2,2	15,2 ± 1,3	0,1512
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>a</sup></b>	29 ± 1,8	30 ± 0,7	34,2 ± 1,0 <sup>§§</sup>	<b>0,014</b>
<b>Diagnóstico [n (%)]</b>				
- Biopsia (NAS)	-	19 (48)	29 (88)	
- Fibroscan (FAST)	-	21 (52)	4 (12)	
<b>Parámetros de Fibroscan<sup>a</sup></b>				
- LSM (kPa)	-	6,9 ± 0,5	9,9 ± 1,0	<b>0,006</b>
- CAP (dB/M)	-	321 ± 10	326 ± 9	0,691
<b>Grado de fibrosis [n (%)]</b>				<b>0,023</b>
- F0	-	6 (30)	3 (11)	
- F1	-	5 (50)	5 (18)	
- F2	-	8 (40)	13 (46)	
- F3	-	1 (5)	7 (25)	

Se realizaron comparaciones entre los grupos de estudio utilizando ANOVA y *t-student* para variables continuas y Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) para variables categóricas. <sup>a</sup>: los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de la media). <sup>b</sup>: años de escolarización. Abreviaturas: NAFL, *non-alcoholic fatty liver*; NASH, *non-alcoholic steatohepatitis*; DCL, deterioro cognitivo leve; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; INR, ratio internacional normalizado; IMC, índice de masa corporal; NAS, *NAFLD activity score* (puntuación de actividad de NAFLD); FAST, *fibroscan-AST score*; LSM, *liver stiffness measurement* (medida de la rigidez hepática); CAP, *controlled attenuation parameter* (parámetro de atenuación controlada). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Sin EHM se representan con <sup>§</sup>. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*/§§:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

## 2 Caracterización de las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes con NAFLD

### 2.1 Diseño de una nueva puntuación para la detección del deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD

En una primera fase del estudio, con una cohorte de 59 pacientes con NAFLD y 53 controles sanos, para la clasificación de los pacientes con NAFLD con o sin deterioro cognitivo leve, como referencia utilizamos, en primer lugar, el PHES (del inglés, *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*), una batería de 5 pruebas psicométricas, considerado como “*gold standard*” para el diagnóstico de la EHM en pacientes cirróticos (ver apartado 5.1, Materiales y métodos). Según el PHES, solo 7 de los 59 pacientes con NAFLD (12%) presentaban deterioro cognitivo leve. Sin embargo, observamos que en otras pruebas psicométricas se desempeñaron significativamente peor que los controles. Por lo tanto, analizamos si cada sujeto mostraba un rendimiento deteriorado en los parámetros analizados por las otras pruebas psicométricas.

Para identificar a los pacientes con NAFLD que presentaban un rendimiento deficiente en cada parámetro medido por estas pruebas, aplicamos el criterio de la media más o menos dos veces la Desviación Estándar (DE) ( $\text{media} \pm 2\text{DE}$ ), calculando la media y la DE del valor de cada parámetro para el grupo control y sumando o restando dos veces la DE (según el parámetro considerado) a esta media para obtener un punto de corte (Tabla 21).

## Resultados

**Tabla 21. Corte y proporción de pacientes con NAFLD que muestran deterioro cognitivo para cada parámetro de las pruebas psicométricas**

Parámetros test	Control <sup>a</sup>	2DE	Punto de corte (media ± 2DE)	Pacientes con NAFLD <sup>a</sup>	% pacientes con deterioro
<b>Bimanual<sup>b</sup></b>	1,91 ± 0,26	0,52	2,43	2,11 ± 0,37**	14
<b>Visuo-motora<sup>b</sup></b>	2,27 ± 0,32	0,64	2,91	2,39 ± 0,50	11
<b>Test d2</b>					
<b>TR (Total respuestas)</b>	444 ± 55	110	334	367 ± 110****	29
<b>TA (Total aciertos)</b>	170 ± 24	48	121	141 ± 40****	<b>29</b>
<b>O (Omisiones)</b>	9 ± 5	13	23	13 ± 12*	20
<b>C (Comisiones)</b>	0,9 ± 1,6	3,23	4,1	2,1 ± 3,2*	15
<b>O+C (Errores totales)</b>	10 ± 5	13	24	15 ± 13**	24
<b>TOT (Índice de efectividad)</b>	426 ± 52	128	548	355 ± 97****	25
<b>CON (Índice de concentración)</b>	167 ± 27	54	221	134 ± 45****	<b>29</b>
<b>Test Stroop</b>					
<b>Tarea congruente</b>	114 ± 18	36	78	104 ± 18**	12
<b>Tarea neutra</b>	86 ± 13	26	60	78 ± 15**	12
<b>Tarea incongruente</b>	49 ± 10	20	28	43 ± 9**	5
<b>Test de claves oral</b>					
<b>Totales ítems</b>	55 ± 6	13	42	48 ± 11 ***	31
<b>Aciertos</b>	54 ± 7	13	41	47 ± 12***	<b>32</b>
<b>Errores</b>	0,5 ± 0,7	1,37	1,85	1,3 ± 2,1*	15
<b>Test de dígitos orales</b>					
<b>Dígitos directos<sup>c</sup></b>	10 ± 2	4	5	8 ± 2**	2
<b>Dígitos inversos<sup>c</sup></b>	7 ± 2	5	2	5 ± 2****	0
<b>Dígitos totales</b>	17 ± 4	8	9	14 ± 4****	2
<b>Test oral de Números y letras<sup>c</sup></b>	10 ± 2	5	5	9 ± 3***	5

<sup>a</sup> los valores se expresan como media ± DE (desviación estándar). <sup>b</sup> tiempo en minutos. <sup>c</sup> número de aciertos. Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. NAFLD: *Non-alcoholic fatty liver disease*. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos \*. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001). En rojo se indican los mayores porcentajes de pacientes NAFLD con deterioro entre los parámetros analizados.

Utilizando estos datos, desarrollamos una nueva puntuación, con el fin de diseñar un nuevo método para la clasificación del deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD.

A partir del punto de corte obtenido para cada parámetro, calculamos la proporción de pacientes con NAFLD que presentaban un rendimiento deteriorado en cada tarea o parámetro. Los pacientes cuya puntuación del parámetro estaba dentro del rango de la media  $\pm 2$  DE se clasificaron como sin deterioro cognitivo leve (sin DCL) y aquellos que se encontraban fuera de este rango, y por tanto presentaban un rendimiento deteriorado para este parámetro, se clasificaron como pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL).

Los pacientes con NAFLD mostraron un peor rendimiento que los controles en la mayoría de los parámetros evaluados en las diferentes pruebas (Tabla 21).

Como se describe en la Tabla 21, el test de clave oral fue la prueba con la mayor proporción de pacientes con deterioro, con un 31 % y un 32 % de pacientes por debajo del punto de corte en los parámetros de respuestas totales y aciertos, respectivamente. Además, el 29% de los pacientes con NAFLD presentaron un rendimiento deteriorado en los parámetros TR (respuestas totales), TA (aciertos totales) y CON (índice de concentración) del test d2. Los pacientes con NAFLD mostraron una leve alteración en la prueba *Stroop*: el 12% falló tanto en las tareas congruente como en las neutral, y el 5% en la tarea incongruente. Asimismo, las tasas de deterioro fueron bajas en tareas de coordinación (14% en coordinación bimanual y 11% en coordinación visuo-motora) y en el test oral de letras y números (5%). Finalmente, no se encontró un déficit significativo entre los pacientes con NAFLD en el test de dígitos, con solo el 2% de los pacientes con deterioro (Tabla 21).

En base a estos resultados, seleccionamos las pruebas psicométricas que podrían ayudar a identificar qué pacientes con NAFLD están afectados por DCL y podrían requerir un seguimiento adecuado. Para desarrollar la nueva puntuación, seleccionamos tres parámetros según dos criterios: deben estar afectados en un gran porcentaje de pacientes con NAFLD y deben evaluar diferentes aspectos de la función neurológica. La combinación de los parámetros seleccionados fueron los parámetros TA y CON del test d2, en los que fallaron en el 29 % de los pacientes, y los aciertos del test de claves oral, en el que fallaron el 32 % de los pacientes (en rojo en la Tabla 21).

Una vez que identificadas las pruebas en las que los pacientes con NAFLD mostraban un rendimiento peor que el grupo control, procedimos a asignar una puntuación

## Resultados

según el método de Adams y Foley (Adams y Foley, 1952). Por lo tanto, se le asignó una puntuación según el resultado obtenido en las tres pruebas, teniendo como referencia la media y la DE obtenida del grupo control por cada parámetro seleccionado.

Los resultados de las pruebas dentro del rango de la media  $\pm 1DE$  se calificaron con 0 puntos, aquellos entre  $\pm 1DE$  y  $\pm 2DE$  más de la media fueron clasificados con -1 puntos, aquellos entre  $\pm 2DE$  y  $\pm 3DE$  se clasificaron con -2 puntos y los peores con media  $\pm 3DE$  fueron puntuados con -3 puntos. Los resultados mejores que la media  $\pm 1DE$  se anotaron con 1 punto, y se van sumando puntos dependiendo si son mejores que 2DS, 3DS y así sucesivamente. El corte entre los resultados normales y patológicos en la batería de prueba se estableció en -5 puntos. De acuerdo con esta nueva puntuación, los pacientes se clasificaron “sin DCL” cuando obtuvieron una puntuación mayor de -5, o como “DCL” si su puntuación era igual o menor a -5.

### **2.2 Comparación de las alteraciones cognitivas en pacientes con NAFL y NASH**

Para evaluar si la aparición del DCL dependía de la progresión de la enfermedad hepática de NAFL a NASH, analizamos el rendimiento de las pruebas psicométricas por separado en estos grupos. El rendimiento no varió significativamente entre los pacientes con NAFL y NASH en ninguno de los parámetros de las pruebas psicométricas (Tabla 22), lo que indica que la progresión de la enfermedad hepática no es el principal factor que contribuye a la aparición del DCL en estos pacientes. Dado que no hubo diferencias significativas entre los pacientes con NAFL y NASH en el rendimiento en las pruebas psicométricas, agrupamos a todos los pacientes con NAFLD ateniendo a la presencia o ausencia de DCL.

Tabla 22. Estudio de las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes con NAFL y NASH

Parámetros test	Controles (n=31)	Pacientes NAFL (n=40)	Pacientes NASH (n=33)	Valor global <i>p</i>
<b>Bateria PHES</b>				
Dígitos y símbolos <sup>a</sup>	42 ± 2	42 ± 2	36 ± 2	0,0574
Conexión numérica A <sup>b</sup>	29 ± 1	34 ± 3	32 ± 2	0,4189
Conexión numérica B <sup>b</sup>	67 ± 4	99 ± 10*	94 ± 6	<b>0,0158</b>
Puntos seriados <sup>b</sup>	60 ± 1	69 ± 4	59 ± 2	<b>0,0252</b>
Línea quebrada <sup>b</sup>	101 ± 3	105 ± 8	104 ± 5	0,9101
<b>Test de coordinación</b>				
Bimanual <sup>c</sup>	1,93 ± 0,05	2,15 ± 0,06*	2,11 ± 0,06	<b>0,0179</b>
Visuo-motora <sup>c</sup>	2,27 ± 0,05	2,39 ± 0,09	2,42 ± 0,06	0,3435
<b>Test D2</b>				
TR (Total respuestas)	435 ± 10	388 ± 19	359 ± 19**	<b>0,0084</b>
TA (Total aciertos)	173 ± 4	149 ± 8*	130 ± 6****	<b>&lt;0,0001</b>
O (Omisiones)	9 ± 1	13 ± 2	17 ± 2*	<b>0,0241</b>
C (Comisiones)	1 ± 0,3	2 ± 0,2	3 ± 0,7*	0,0609
O+C (Errores totales)	10 ± 1	14 ± 2	18 ± 3*	<b>0,0423</b>
TOT (Índice de efectividad)	425 ± 10	384 ± 16	334 ± 17***	<b>0,0012</b>
CON (Índice de concentración)	169 ± 5	145 ± 8*	125 ± 6***	<b>0,0003</b>
<b>Test Stroop</b>				
Tarea congruente	115 ± 3	106 ± 3	102 ± 3*	<b>0,0159</b>
Tarea neutra	86 ± 3	81 ± 3	77 ± 3	0,0941
Tarea incongruente	49 ± 2	46 ± 1	38 ± 2*	<b>0,0161</b>
<b>Test de claves oral</b>				
Totales ítems	55 ± 1	50 ± 2	46 ± 2*	<b>0,0173</b>
Aciertos	54 ± 1	49 ± 2	45 ± 2*	<b>0,0150</b>
Errores	0,5 ± 0,1	1 ± 0,3	1,2 ± 0,3	0,1931
<b>Test de dígitos oral</b>				
Dígitos directos <sup>a</sup>	9 ± 0,4	9 ± 0,4	8 ± 0,4*	<b>0,0482</b>
Dígitos inversos <sup>a</sup>	7 ± 0,4	6 ± 2,3*	5 ± 1,5**	<b>0,0028</b>
<b>Test de letras y números</b>				
Aciertos	10 ± 0,4	9 ± 0,5	8 ± 0,4*	<b>0,0204</b>

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve <sup>a</sup> número de aciertos; <sup>b</sup> tiempo en segundos; <sup>c</sup> tiempo en minutos. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos \*. (\* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; \*\*\*\* *p* < 0,0001).

## Resultados

### 3 Clasificación de los pacientes NAFLD según la presencia del deterioro cognitivo leve

#### 3.1 Comparación de parámetros clínicos

Las características clínicas de los controles y pacientes se resumen en la Tabla 23. En general, el 30% de los pacientes (22 de 73) fueron clasificados como DCL según el criterio de la media $\pm$ 2DE. Utilizando la nueva puntuación desarrollada para el diagnóstico del deterioro cognitivo en NAFLD, los pacientes con DCL mostraron una puntuación (-7,2 $\pm$ 0,4) significativamente menor que la obtenida por los pacientes sin DCL (-1 $\pm$ 0,3; p<0,0001) y controles (-0,8 $\pm$ 0,3; p<0,0001) (Tabla 23).

Ambos grupos de pacientes (con o sin DCL) y controles tenían características demográficas (edad y sexo) y educativas similares. En comparación con el grupo control, los pacientes con NAFLD mostraron mayores niveles de marcadores del daño hepático, como AST y ALT (p=0,0012 y p<0,0001, respectivamente) (Tabla 23). El número total de plaquetas en los pacientes NAFLD con DCL aumentaba significativamente respecto a los controles y a los pacientes sin DCL (p<0,05 y p<0,01, respectivamente) (Tabla 23). Finalmente, en la Tabla 23, se indica que la distribución de los pacientes según la gravedad del daño hepático (NAFL y NASH), en los grupos de pacientes sin DCL y con DCL, era homogénea, sin diferencias significativas (p=0,630).

**Tabla 23. Características clínicas de los controles y pacientes clasificados por la presencia del deterioro cognitivo leve (DCL)**

Parámetros	Control	Pacientes NAFLD sin DCL	Pacientes NAFLD con DCL	Valor global <i>p</i>
Número de sujetos [n (% del total de los pacientes)]	64	51(70)	22(30)	
Edad <sup>a</sup>	58 ± 1,0	58 ± 1,1	59 ± 2,4	0,966
Sexo [n (%)]				0,370
- Masculino	34 (53)	26 (51)	9 (41)	
- Femenino	30 (47)	25 (49)	13 (59)	
Educación <sup>a</sup>	15 ± 1,2	14 ± 0,6	12 ± 0,9	0,181
<b>Comorbilidad [n (%)]</b>				
- Diabetes mellitus	-	18 (35)	12 (60)	0,060
- Dislipemia		30 (59)	12 (60)	0,392
- Hipertensión arterial		25 (49)	13 (65)	0,356
- Síndrome metabólico		21 (41)	12 (60)	0,256
<b>Parámetros analíticos<sup>a</sup></b>				
- AST (U/L)	25,8 ± 1,2	37,8 ± 3,0**	36,5 ± 3,6*	<b>0,0012</b>
- ALT (U/L)	25,7 ± 1,7	46,5 ± 3,6****	45,4 ± 5,1**	<b>&lt;0,0001</b>
- Albúmina (g/dL)	4,4 ± 0,04	4,4 ± 0,04	4,3 ± 0,09	0,205
- Bilirrubina (mg/dL)	0,5 ± 0,03	0,8 ± 0,07	0,6 ± 0,12	0,067
- Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,02	0,8 ± 0,03	0,8 ± 0,07	0,845
- Plaquetas (x10 <sup>9</sup> )	242 ± 9	227 ± 10	292 ± 23*§§	<b>0,005</b>
- INR	1,01 ± 0,00	1,02 ± 0,01	1,2 ± 0,19	0,099
- Amonio (µM)	9,9 ± 0,5	15,1 ± 1,3**	18,2 ± 3,1***	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Diagnóstico [n (%)]</b>				
- NAFL	-	27 (53)	13 (59)	0,630
- NASH		24 (47)	9 (41)	
Puntuación DCL <sup>a</sup>	-0,8 ± 0,3	-1,0 ± 0,3	-7,2 ± 0,4****/§§§§	<b>&lt;0,0001</b>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	29 ± 1,8	32 ± 0,7	32,4 ± 1,5	0,415

Se realizaron comparaciones entre 2 grupos de pacientes utilizando t-student para datos continuos y Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) para datos categóricos. <sup>a</sup>: los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). NAFL, *non-alcoholic fatty liver* (hígado graso no alcohólico); NASH, *non-alcoholic steatohepatitis* (esteatohepatitis no alcohólica); DCL, deterioro cognitivo leve; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; INR, ratio internacional normalizado; IMC, índice de masa corporal; NAS, *NAFLD activity score* (puntuación de actividad de NAFLD). Las diferencias significativas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con §. (\*: p<0,05; \*\*/§§: p<0,01; \*\*\*: p<0,001; \*\*\*\*/§§§§: p<0,0001).

## Resultados

### 3.2 Influencia de comorbilidades en la prevalencia de DCL en pacientes con NAFLD

Los datos presentados en la Tabla 24 muestran que la presencia de diabetes, síndrome metabólico e hipertensión arterial aumentan la prevalencia de DCL hasta el 40, 36 y 34% de los pacientes con NAFLD, en comparación con el 19, 21 y 21% en ausencia de estas comorbilidades, respectivamente. La dislipemia no parecía afectar significativamente a la prevalencia de DCL en estos pacientes (Tabla 24).

**Tabla 24. Influencia de la diabetes, la hipertensión, la dislipemia y el síndrome metabólico en la prevalencia de DCL en pacientes con NAFLD**

Parámetros		Pacientes con DCL (n)	Pacientes totales (n)	Prevalencia de DCL (%)
<b>Comorbilidades</b>				
- Diabetes mellitus	<i>SI</i>	12	30	40%
	<i>NO</i>	8	41	19%
- Dislipemia	<i>SI</i>	12	42	29%
	<i>NO</i>	8	29	28%
- Hipertensión arterial	<i>SI</i>	13	38	34%
	<i>NO</i>	7	33	21%
- Síndrome metabólico	<i>SI</i>	12	33	36%
	<i>NO</i>	8	38	21%

DCL, deterioro cognitivo leve; n, número de sujetos

## 4 Estudio de las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes NAFLD clasificados según la presencia de DCL

En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos en los diferentes grupos de estudio. Para la realización del estudio de las alteraciones cognitivas y motoras en los pacientes con NAFLD y controles, se utilizaron, además de la batería PHES, otros test psicométricos específicos para la evaluación de diferentes funciones ejecutivas como la velocidad de procesamiento, la atención selectiva y el control inhibitorio verbal, la atención selectiva-

sostenida, concentración, memoria de trabajo y coordinación (ver apartado 5 de Materiales y métodos).

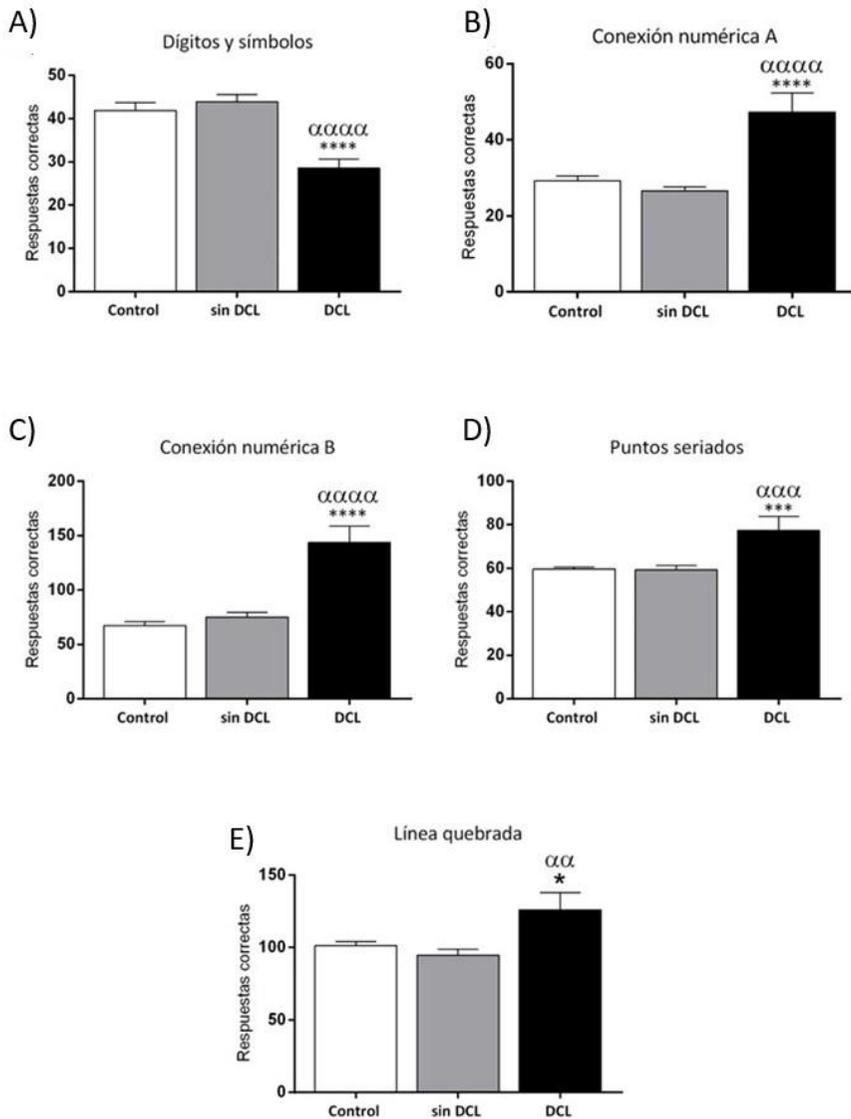
**Tabla 25. Estudio de las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes NAFLD sin y con DCL**

Parámetros test	Controles (n=31)	Pacientes sin DCL (n=51)	Pacientes con DCL (n=22)	Valor global p
<b>PHES</b>				
Dígitos y símbolos <sup>a</sup>	42 ± 2	44 ± 2	28 ± 2****/ \$\$\$	<0,0001
Conexión numérica A <sup>b</sup>	29 ± 1	27 ± 1	47 ± 5****/ \$\$\$	<0,0001
Conexión numérica B <sup>b</sup>	67 ± 4	75 ± 15	144 ± 15****/ \$\$\$	<0,0001
Puntos seriados <sup>b</sup>	60 ± 1	59 ± 2	77 ± 6****/ \$\$\$	0,0002
Línea quebrada <sup>b</sup>	101 ± 3	94 ± 4	126 ± 12*/ \$\$	0,0016
<b>Test de coordinación</b>				
Bimanual <sup>c</sup>	1,93 ± 0,05	2,03 ± 0,04	2,42 ± 0,09****/ \$\$\$	<0,0001
Visuo-motora <sup>c</sup>	2,27 ± 0,05	2,26 ± 0,05	2,72 ± 0,11****/ \$\$\$	<0,0001
<b>Test d2</b>				
TR (Total respuestas)	435 ± 10	420 ± 12	272 ± 20****/ \$\$\$	<0,0001
TA (Total aciertos)	173 ± 4	159 ± 4	101 ± 8****/ \$\$\$	<0,0001
O (Omisiones)	9 ± 1	14 ± 1	15 ± 4	0,0942
C (Comisiones)	1 ± 0,3	1 ± 0,2	5 ± 1,2****/ \$\$\$	<0,0001
O+C (Errores totales)	10 ± 1	14 ± 1	19 ± 4*	0,0155
TOT (Índice de efectividad)	425 ± 10	402 ± 10	253 ± 19****/ \$\$\$	<0,0001
CON (Índice de concentración)	169 ± 5	157 ± 5	92 ± 7****/ \$\$\$	<0,0001
<b>Test Stroop</b>				
Tarea congruente	115 ± 3	111 ± 2	90 ± 3****/ \$\$\$	<0,0001
Tarea neutra	86 ± 3	84 ± 2	69 ± 3****/ \$\$\$	0,0002
Tarea incongruente	49 ± 2	46 ± 1	38 ± 2****/ \$\$	0,0004
<b>Test de claves oral</b>				
Totales ítems	55 ± 1	53 ± 1	38 ± 2****/ \$\$\$	<0,0001
Aciertos	54 ± 1	52 ± 1	36 ± 2****/ \$\$\$	<0,0001
Errores	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,7 ± 0,5*	0,0404
<b>Test de dígitos oral</b>				
Dígitos directos <sup>a</sup>	9 ± 0,4	9 ± 0,3	8 ± 0,5*	0,0358
Dígitos inversos <sup>a</sup>	7 ± 0,4	6 ± 0,3*	4 ± 0,4****/ \$	0,0002
<b>Test de letras y números</b>				
Aciertos	10 ± 0,4	9 ± 0,5	7 ± 0,6****/ \$	0,0004

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve. <sup>a</sup> número de aciertos; <sup>b</sup> tiempo en segundos; <sup>c</sup> tiempo en minutos. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos \*. Los valores significativamente diferentes en pacientes con DCL en comparación con pacientes sin DCL se indican mediante <sup>§</sup>. (\*/\$ p < 0,05; \$\$ p < 0,01; \*\*\*\*/ \$\$\$ p < 0,001; \*\*\*\*\*/ \$\$\$ p < 0,0001).

## Resultados

### 4.1 Batería de test psicométricos PHES



**Figura 24. Resultados obtenidos en la batería de test psicométricos PHES.** Se representan los resultados obtenidos en las 5 pruebas de la batería 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. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. DCL: deterioro cognitivo leve. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ) (\*:  $p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$   $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

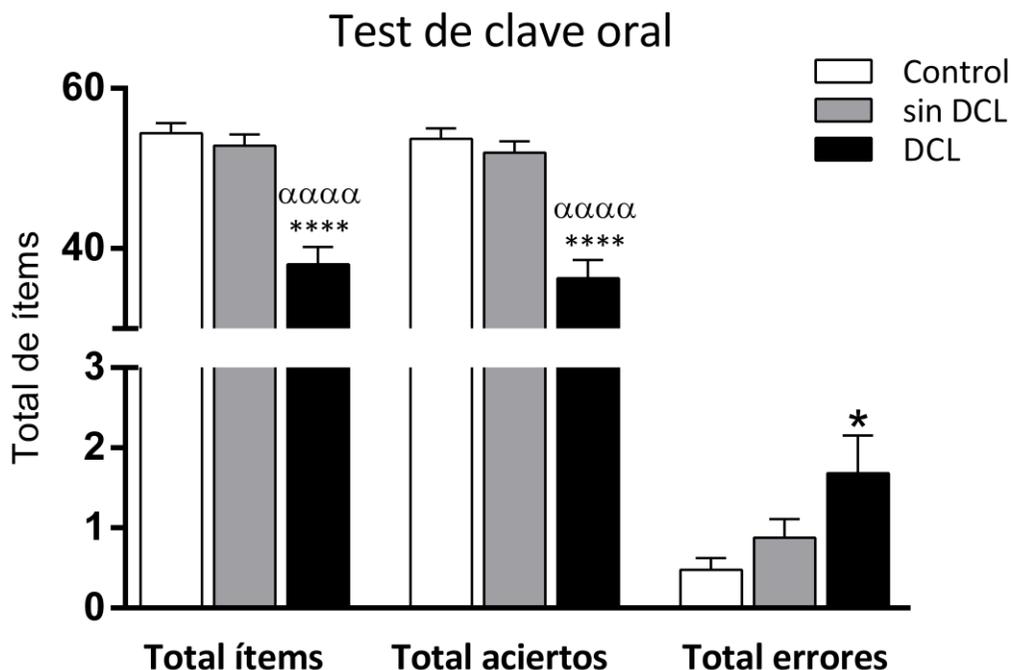
La batería de test PHES comprende 5 pruebas psicométricas que evalúan la concentración, atención, la velocidad motora, percepción visual y orientación visuo-espacial (ver apartado 5.1 de Materiales y métodos). Como se puede observar en la Figura 24 y en la Tabla 25, en todas las pruebas psicométricas, se registró un deterioro exclusivo de los pacientes con DCL, ya que realizaron las pruebas peor que los otros grupos, con diferencias significativas tanto respecto al grupo control como a los pacientes sin DCL (Tabla 25; Figura 24).

### **4.2 Atención selectiva y velocidad de procesamiento: Test de clave oral**

Para la evaluación de la atención selectiva y velocidad de procesamiento mental, se utilizó el test de claves oral, pertenece a la batería WAIS (*Wechsler Adult Intelligence Scale*). Como se ha descrito en la sección 5.2.3 del apartado de Materiales y métodos, los sujetos fueron instruidos para completar, de forma oral, un ejercicio de emparejamiento de números con símbolos dentro de un límite de tiempo establecido. Se registró el número total de emparejamientos realizados, el número de emparejamientos correctos el número total de errores. Los pacientes con DCL obtuvieron un número total de ítems y de aciertos significativamente menor que los pacientes sin DCL y el grupo control. En cuanto a los errores, los pacientes con DCL registraron más emparejamientos incorrectos con respecto a los controles, con una tendencia a ser mayor con respecto a los pacientes sin DCL, aunque sin diferencias significativas (Tabla 25; Figura 25).

En general se puede confirmar que los pacientes con NAFLD y deterioro cognitivo leve tienen un importante déficit de la atención selectiva y velocidad de procesamiento respecto a los pacientes NAFLD sin DCL y al grupo de sujetos sanos.

## Resultados

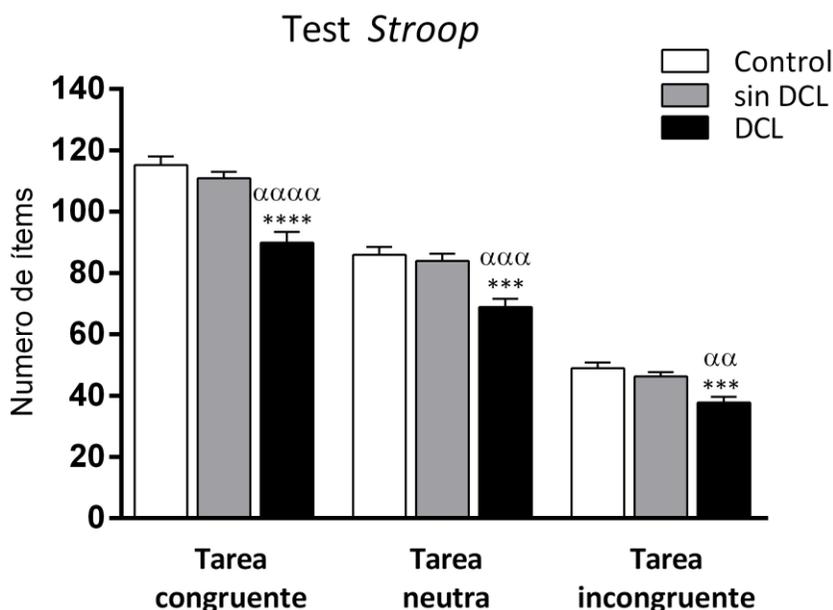


**Figura 25. Resultados obtenidos en el test de claves oral.** Se representan el número total de respuestas completadas (Total ítems), el número total de emparejamientos correctos (Total aciertos) y el número total de respuestas incorrectas (Total errores). DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores 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 DCL se representan con ( $\alpha$ ) (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

### 4.3 Flexibilidad cognitiva y control inhibitorio verbal: Test *Stroop*

El test *Stroop* se utiliza para evaluar la velocidad de procesamiento, mediante los resultados obtenidos en la tarea congruente y neutra, y la flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada, analizando los resultados obtenidos en la tarea incongruente (ver apartado 5.2.2, Material y métodos). Analizando los valores obtenidos en las tres diferentes pruebas, se registró una disminución en la flexibilidad cognitiva e inhibición de la respuesta automatizada solo en los pacientes con DCL, ya que en la tarea incongruente obtuvieron una puntuación significativamente menor con respecto a los controles y a los pacientes NAFLD

sin DCL. Además, confirmamos un empeoramiento en la velocidad de procesamiento de los pacientes con DCL, debido a la menor puntuación realizada en las tareas congruente y neutra respecto a los otros grupos del estudio. (Tabla 25, Figura 26).



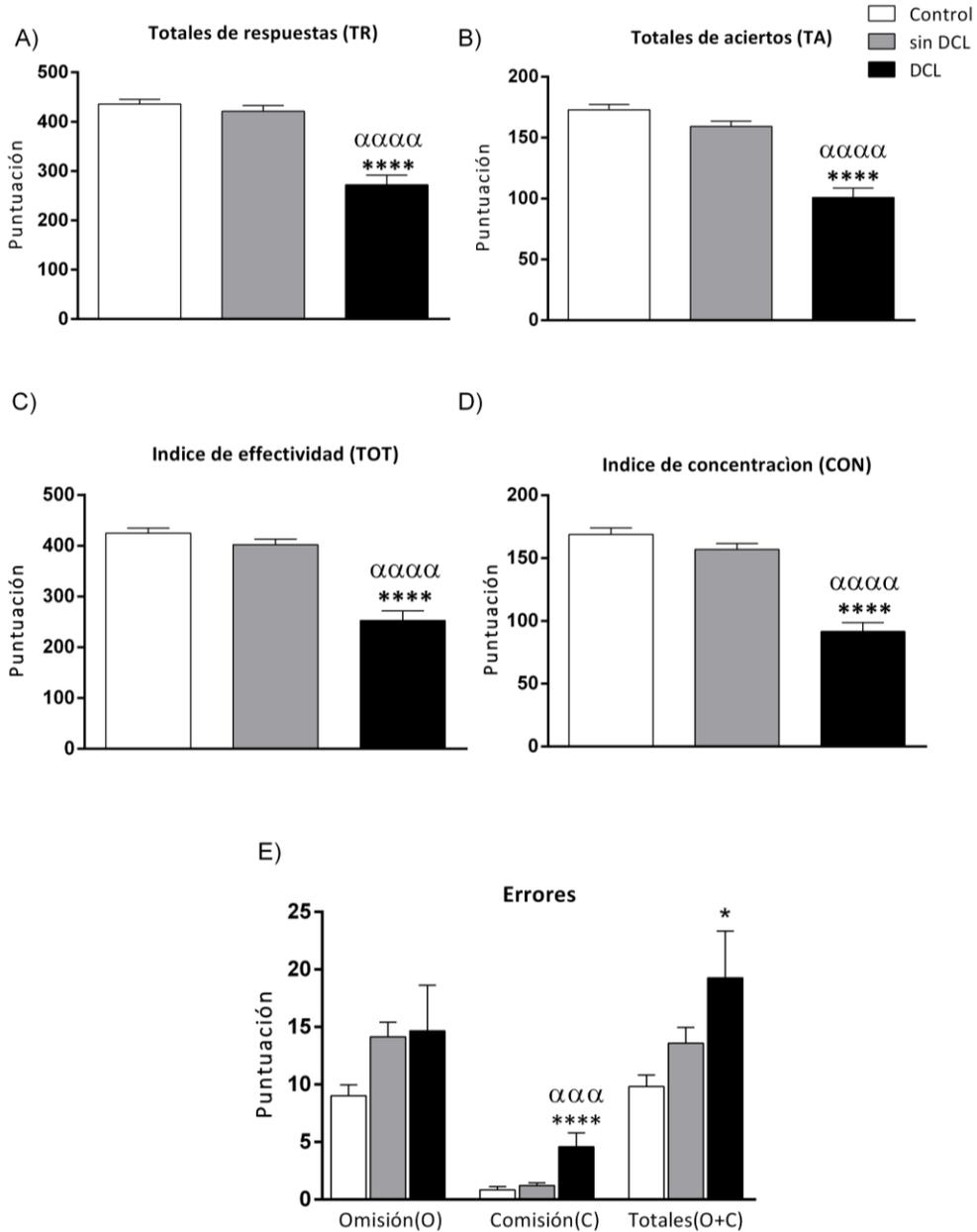
**Figura 26. Resultados obtenidos en el test Stroop.** Se representan el número de ítems de la tarea congruente, la tarea neutra y la tarea incongruente. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ) ( $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ;  $***/\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$   $*****/\alpha\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

#### 4.4 Atención selectiva- sostenida y concentración: Test d2

La evaluación de la atención selectiva-sostenida y la concentración se llevó a cabo mediante el test d2, realizado como se ha descrito en el apartado 5.2.1 de Materiales y métodos. Una vez realizado el test, se analiza el número total de ítems (TR), los aciertos totales (TA), y los errores totales (C+O) resultantes de la suma del número total de comisiones (C) y omisiones (O). A partir de estos datos se calcula el índice de efectividad [TOT=TR- (C+O)] y el índice de concentración (CON=TA-C).

# Resultados

## Test d2



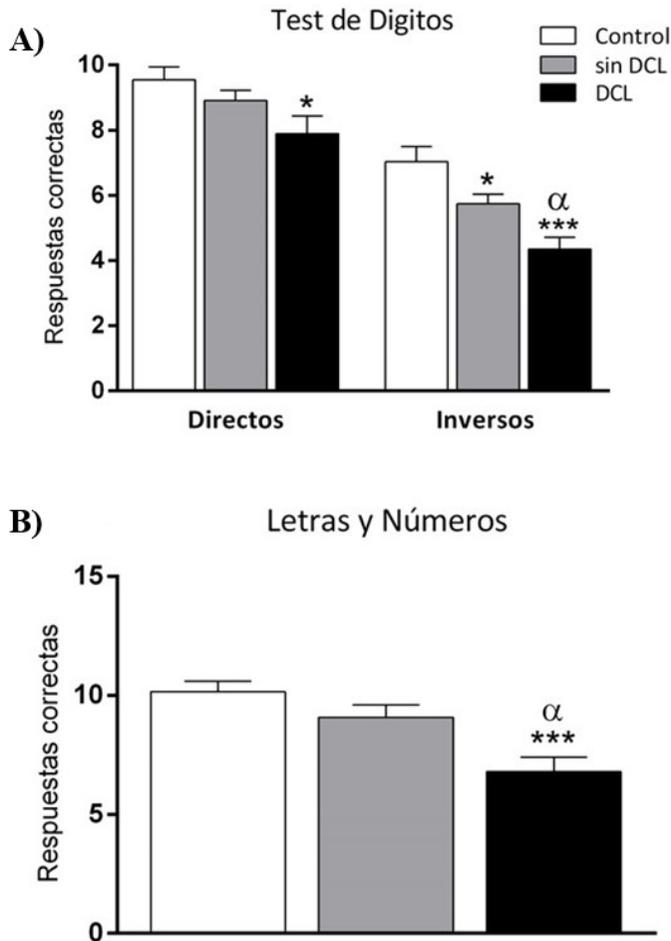
**Figura 27. Resultados obtenidos en el test d2.** Se representan la puntuación del total de respuestas (TR), del total de aciertos (TA), del índice de efectividad (TOT), del índice de concentración (CON), de las omisiones (O), de las comisiones (C) y del total de los errores (O+C). DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores se representan con la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ): (\*:  $p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$  \*\*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

Entre los pacientes con NAFLD, solo los pacientes con DCL obtuvieron una peor puntuación en casi todos los parámetros analizados, con diferencia significativa en comparación con el grupo control y con los pacientes sin deterioro cognitivo. En cuanto a los errores totales los pacientes con DCL presentaban diferencias significativas solo con respecto al grupo control, mientras que no se encontraron diferencias significativas, entre los tres grupos, en el análisis de los valores de las omisiones (Tabla 25; Figura 27). Por lo tanto, estos resultados indicaron una disminución en las funciones de atención selectiva-sostenida y de la concentración en los pacientes con deterioro cognitivo leve, que no se encontró en los pacientes con NAFLD sin DCL.

### **4.5 Memoria de trabajo: Test de dígitos y test oral de letras y números**

Utilizamos dos pruebas diferentes para la evaluación de la memoria de trabajo, el test de dígitos y el test letras y números (batería de test WAIS), de acuerdo con lo detallado en las secciones 5.2.4 y 5.2.5 del apartado de Materiales y métodos. Se analizaron las series realizadas correctamente en las pruebas, y se observó que una puntuación más baja está asociada con una peor memoria de trabajo. Particularmente, los pacientes con DCL en el test de dígitos directos, obtuvieron una puntuación total menor respecto a los otros grupos del estudio, pero se registró una diferencia significativa solo con el grupo control. Sin embargo, los pacientes con NAFLD realizaron un menor número de aciertos en el test de dígitos inversos con respecto al grupo control, con diferencias significativas, tanto en el grupo sin DCL ( $p<0,05$ ) como el grupo con DCL ( $p<0,001$ ). Además, los pacientes con DCL registraron una puntuación significativamente menor también respecto a los pacientes sin DCL ( $p<0,005$ ). En cuanto al test de letras y números, los pacientes con DCL siguen mostrando un resultado significativamente peor que el grupo control ( $p<0,05$ ) y los sujetos sin DCL ( $p<0,001$ ). (Tabla 25; Figura 28). Con estos datos podemos confirmar que los pacientes con deterioro cognitivo leve muestran un empeoramiento en la memoria de trabajo.

## Resultados

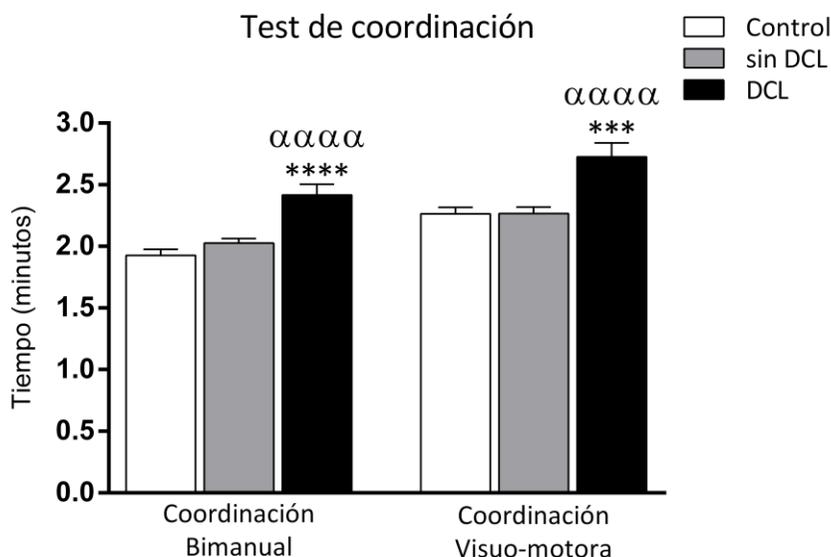


**Figura 28. Resultados obtenidos en el test de dígitos y test de letras y números.** Se representan: A) las respuestas correctas de dígitos directos e inversos; B) las respuestas correctas del test de letras y números. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. DCL: deterioro cognitivo leve. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ) (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ; \*\*\*/ $\alpha$ :  $p < 0,001$ ).

### 4.6 Estudios de las alteraciones motoras: Test de coordinación

Para evaluar las alteraciones motoras en estos pacientes, se utilizaron dos pruebas de coordinación: bimanual y visuo-motora. Se evalúa el tiempo que tarda en el terminar la tarea (ver apartado 5.3, Materiales y métodos). Los datos obtenidos confirmaron una evidente

alteración motora en los pacientes con DCL, dado el mayor tiempo empleado para la realización de ambos test, con respecto a los sujetos sanos y a los pacientes sin DCL (Tabla 25, Figura 29).



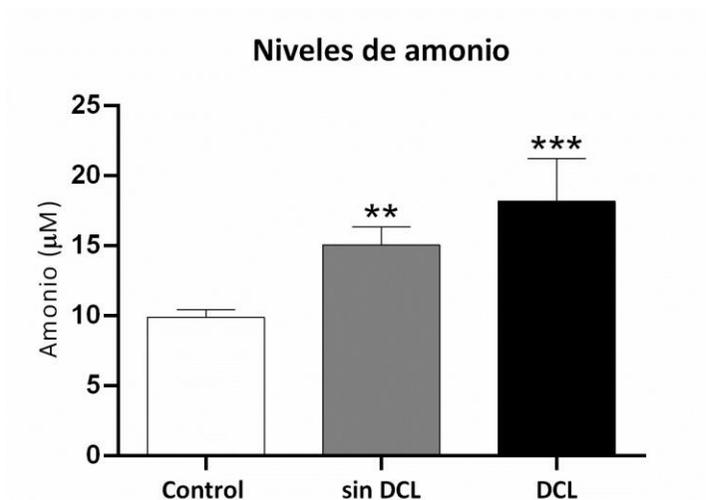
**Figura 29. Resultados obtenidos en los test de coordinación bimanual y visuo-motora.** Se representa el tiempo en minutos que tardan en finalizar la tarea. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ) (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

## 5 Determinación de los niveles de amonio en la sangre

Los controles presentaron un nivel medio de amonio en sangre de  $9,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ . Debido al daño hepático, los niveles de amonio en sangre de los pacientes con NAFLD fueron significativamente mayores con respecto al grupo Control, siendo de  $15,1 \pm 1,3 \mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) en el grupo sin DCL y de  $18,2 \pm 3,1 \mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) en el grupo con DCL (Figura 30).

Los pacientes con deterioro cognitivo leve presentaron un nivel medio de amonio mayor respecto al grupo sin DCL, pero sin diferencias estadísticas significativas.

## Resultados



**Figura 30. Niveles de amonio en sangre en pacientes con NAFLD y controles.** Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. DCL: deterioro cognitivo leve. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

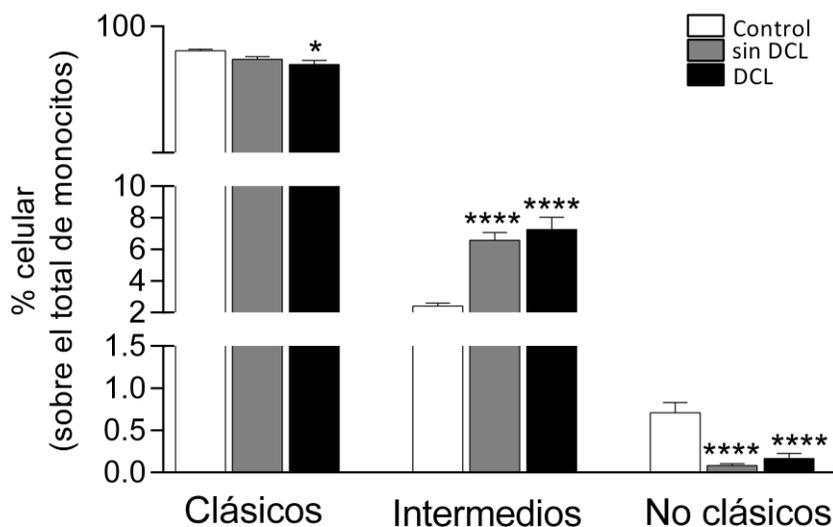
## 6 Estudio de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica mediante citometría de flujo

Caracterizamos las poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo (ver apartado 12, Materiales y Métodos) a partir de la sangre periférica. En particular, analizamos las poblaciones de los monocitos circulantes, las poblaciones y subpoblaciones de los linfocitos B y T, concentrándonos en las poblaciones efectoras de los linfocitos T *helper*, y su activación.

### 6.1 Estudio de los monocitos en sangre periférica

Los pacientes con NAFLD muestran mayor porcentaje de monocitos intermedios  $CD14^+CD16^+$ , proinflamatorios en comparación con los controles ( $p < 0,0001$ ). Este aumento se asoció con un porcentaje reducido de monocitos  $CD14^{++}CD16^-$  no inflamatorios clásicos.

Asimismo, los pacientes con NAFLD mostraron una disminución significativa del porcentaje de monocitos no clásicos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>. (Figura 31, Tabla 26)



**Figura 31. Poblaciones de monocitos en sangre periférica en pacientes con NAFLD y controles.** Se representan los diferentes subtipos de monocitos (clásicos, intermedios y no clásicos) en % celular sobre el total de monocitos. Los valores se representan como la media ± EEM. DCL: deterioro cognitivo leve. Las diferencias significativas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). (\* p<0,05; \*\*\*\* p<0,0001).

**Tabla 26. Porcentaje de monocitos circulantes en pacientes y controles.**

Monocitos	Control	Pacientes sin DCL	Pacientes con DCL	Valor global p
<b>% Poblacional</b>				
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> (Clasicos)	95,20 ± 0,27	93,50 ± 0,54	92,49 ± 0,76*	<b>0,0139</b>
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> (Intermedios)	2,41 ± 0,18	6,57 ± 0,50****	7,27 ± 0,77****	<b>&lt; 0,0001</b>
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> (No clasicos)	0,71 ± 0,12	0,08 ± 0,02****	0,16 ± 0,06****	<b>&lt; 0,0001</b>

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos \*. (\* p < 0,05; \*\*\*\* p < 0,0001).

## Resultados

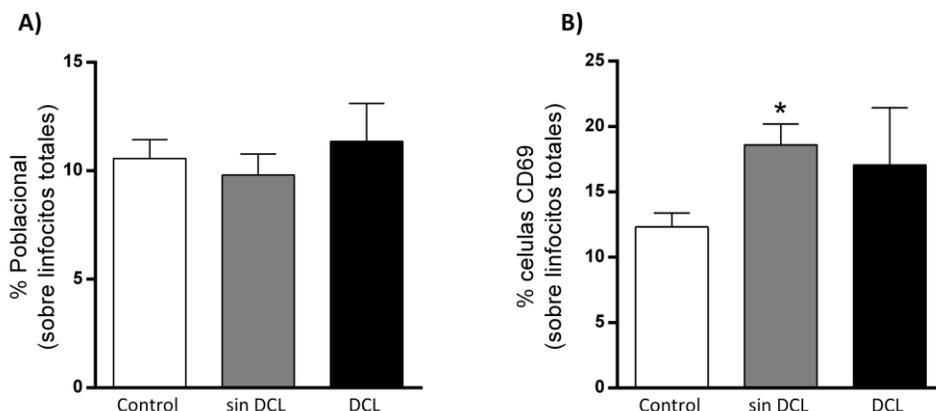
### 6.2 Estudio de los linfocitos en sangre periférica

#### 6.2.1 Linfocitos B

Analizamos no solo la población de linfocitos B dentro del total de linfocitos, sino también evaluamos sus subpoblaciones *naïve* y de memoria. También se estudió la proporción de los plasmoblastos, células sanguíneas aún en desarrollo especializadas en sintetizar anticuerpos (ver apartado 12.1.2 de Materiales y métodos).

#### ➤ Población linfocitos B totales y activación

El análisis de la población total de linfocitos B no reveló ninguna diferencia significativa en el porcentaje de linfocitos totales entre los grupos de estudio. En cuanto a su activación, debida a la expresión del biomarcador temprano CD69, los pacientes con NAFLD mostraban una mayor proporción de células activadas respecto al grupo control, con diferencia significativa entre los pacientes sin DCL y los controles (Figura 32, Tabla 27).



**Figura 32. Población de linfocitos B totales y su activación en pacientes con NAFLD y controles.** Se representa A) el porcentaje total de linfocitos B sobre el total de linfocitos, B) el porcentaje de células activadas (CD69+) dentro la población de linfocitos B totales. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). (\*: p<0,05).

**Tabla 27. Linfocitos B totales y su activación en pacientes y controles.** Se indica el porcentaje poblacional y el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) dentro del total de linfocitos.

Linfocitos B totales	Control	Pacientes sin DCL	Pacientes con DCL	Valor global <i>p</i>
<b>% Poblacional (dentro del total de linfocitos)</b>				
	10,56 ± 0,9	9,80 ± 0,7	11,36 ± 1,74	0,6549
<b>% Células activadas (células CD69<sup>+</sup> dentro de la población)</b>				
	12,33 ± 1,06	18,59 ± 1,61*	17,05 ± 4,39	<b>0,0526</b>

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos \*. (\**p* < 0,05).

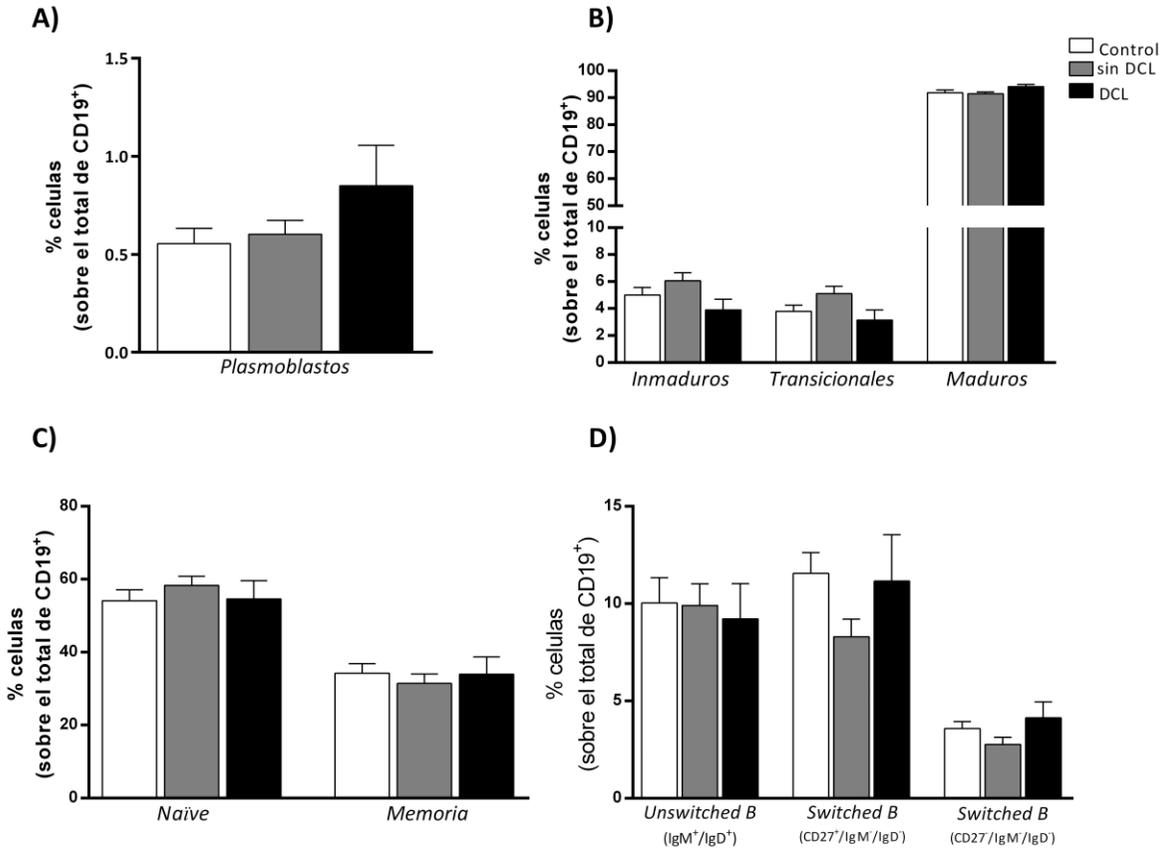
### ➤ Subpoblaciones de linfocitos B y activación

En el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B analizamos la proporción de los plasmoblastos en sangre, sobre el total de CD19<sup>+</sup>, pero no se encontraron diferencias significativas entre los sujetos de estudio, solo una tendencia a aumentar en los pacientes con DCL, con respecto a los controles y a los pacientes sin DCL (Figura 33A) (Tabla 28). Tampoco se encontraron diferencias significativas en las proporciones de linfocitos B inmaduros, transicionales y maduros (Figura 33B) (Tabla 28). De igual forma sucede con los linfocitos B *naïve*, los de memoria y en todas las subpoblaciones de los linfocitos B de memoria (Figura 33C-D, Tabla 28).

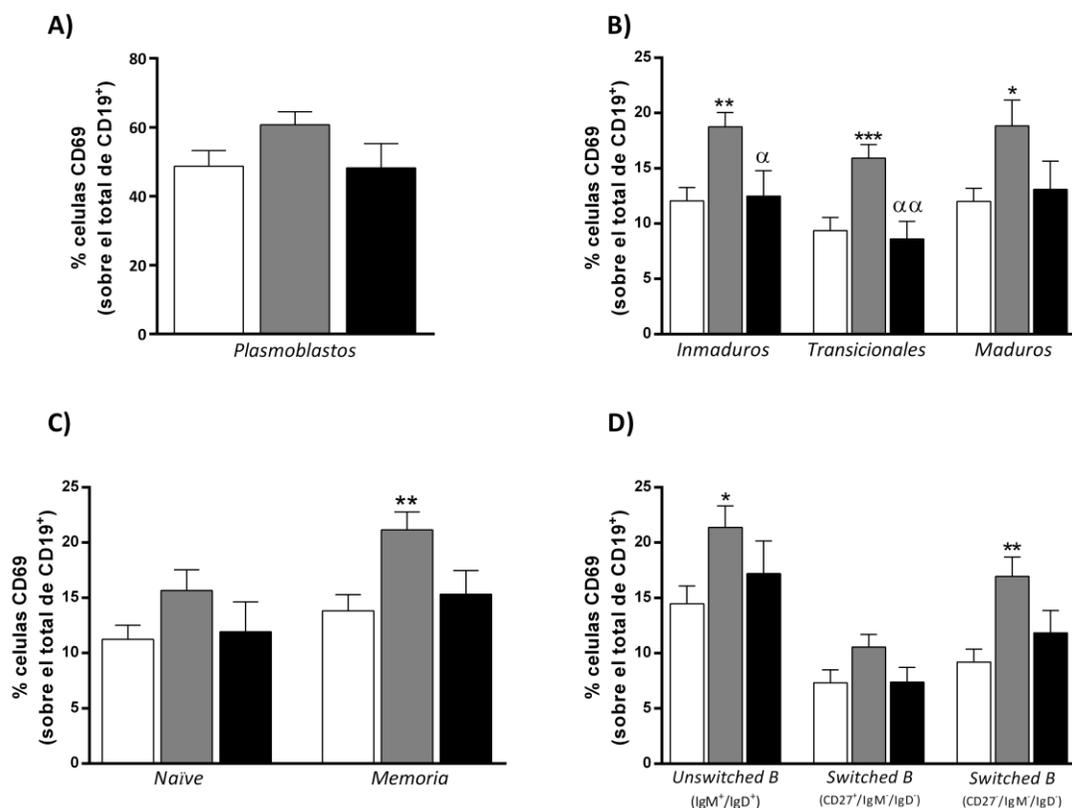
En cuanto a su activación, la proporción de células inmaduras, transicionales y maduras que presentan el marcador CD69 era significativamente mayor en los pacientes sin DCL en comparación con sujetos sanos y pacientes con DCL (Figura 34A-B, Tabla 28). Del mismo modo, se detectó un aumento significativo en los linfocitos B de memoria activados en pacientes sin DCL en comparación con el grupo control, y una ligera tendencia al aumentar en la población *naïve* de linfocitos B, pero sin diferencias significativas (Figura 34C, Tabla 28). Finalmente, el grupo sin DCL presentó un porcentaje de activación en linfocitos B de memoria *unswitched* y de memoria *switched* doble negativo significativamente mayor que

## Resultados

los controles, mientras que en las células de memoria *switched* doble negativo no se apreciaron diferencias entre los grupos de estudio (Figura 34D, Tabla 28).



**Figura 33. Subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con NAFLD y controles.** Se representan los porcentajes referidos a la población de linfocitos B totales (CD19<sup>+</sup>): A) Porcentaje celular de plasmoblastos, B) Porcentaje celular de linfocitos B inmaduros, transicionales y maduros, C) Porcentaje celular de linfocitos B *naïve* y de memoria, D) Porcentaje celular de linfocitos B unswitched y switched. DCL: deterioro cognitivo leve.



**Figura 34. Activación de subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con NAFLD y controles.** Se muestra el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) de cada población dentro del total de la población estudiada: A) Porcentaje celular de plasmoblastos, B) Porcentaje celular de linfocitos B inmaduros, transicionales y maduros, C) Porcentaje celular de linfocitos B *naive* y de memoria, D) Porcentaje celular de linfocitos B unswitched y switched. DCL: deterioro cognitivo leve. 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 DCL se representan con ( $\alpha$ ). (\*/ $\alpha$ :  $p < 0,05$ ; \*\*/ $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ; \*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$ ).

## Resultados

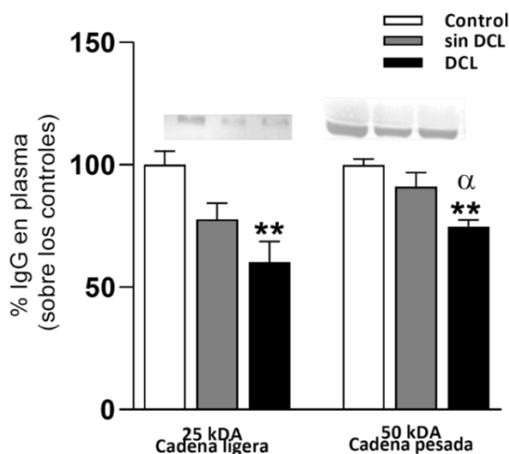
**Tabla 28. Subpoblaciones de linfocitos B y su activación en pacientes y controles.** Se indica el porcentaje poblacional y el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) dentro del total de linfocitos B.

<i>Población</i>	<b>Control</b>	<b>Pacientes sin DCL</b>	<b>Pacientes con DCL</b>	<b>Valor global <i>p</i></b>
<b>% Poblacional (sobre linfocitos CD19<sup>+</sup>)</b>				
<b>Plasmoblastos</b>	0,55 ± 0,07	0,60 ± 0,07	0,85 ± 0,20	0,1874
<b>Inmaduros</b>	5,00 ± 0,55	6,06 ± 0,59	3,89 ± 0,80	0,1201
<b>Transicional</b>	3,80 ± 0,44	5,11 ± 0,54	3,15 ± 0,76	0,0658
<b>Maduros</b>	91,88 ± 0,93	91,47 ± 0,67	94,10 ± 0,78	0,1938
<i>Naïve</i>	54,09 ± 3,03	58,28 ± 2,53	54,54 ± 5,11	0,5453
<b>Memoria</b>	34,25 ± 2,58	31,46 ± 2,60	33,99 ± 4,72	0,7359
<i>Unswitched B</i>	10,03 ± 1,29	9,90 ± 1,11	9,22 ± 1,80	0,9298
<i>Switched B</i>	11,55 ± 1,07	8,29 ± 0,92	11,16 ± 2,38	0,1019
<i>Switched B (doble negative)</i>	3,58 ± 0,37	2,76 ± 0,37	4,13 ± 0,82	0,1348
<b>% Células activadas (células CD69<sup>+</sup> dentro de la población)</b>				
<b>Plasmoblastos</b>	48,69 ± 4,56	60,71 ± 3,85	48,22 ± 7,03	0,2781
<b>Inmaduros</b>	12,06 ± 1,20	18,75 ± 1,29 **	12,50 ± 2,29 §	<b>0,0012</b>
<b>Transicionale</b>	9,36 ± 1,19	15,93 ± 1,22 ***	8,62 ± 1,56 §§	<b>0,0003</b>
<b>Maduros</b>	12,02 ± 1,18	18,85 ± 2,33 *	13,08 ± 2,57	<b>0,0444</b>
<i>Naïve</i>	11,23 ± 1,30	15,67 ± 1,87	11,94 ± 2,70	0,1607
<b>Memoria</b>	13,82 ± 1,45	21,16 ± 1,61 **	15,32 ± 2,14	<b>0,0039</b>
<i>Unswitched B</i>	14,46 ± 1,61	21,38 ± 1,96 *	17,19 ± 2,96	<b>0,0355</b>
<i>Switched B</i>	7,31 ± 1,18	10,55 ± 1,14	7,38 ± 1,34	0,0977
<i>Switched B (doble negative)</i>	9,20 ± 1,16	16,94 ± 1,75 **	11,85 ± 2,02	<b>0,0027</b>

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con § (\*§: p<0,05; \*\*§§: p<0,01; \*\*\*: p<0,001).

### 6.2.1.1 Niveles de IgG

Puesto que las inmunoglobulinas son el principal producto de los linfocitos B activados, medimos por *Western blot* (ver apartado 10.2 de Materiales y métodos) la cantidad de IgG, tanto la cadena ligera (25 KDa) como la pesada (50 KDa), presente en el plasma de los sujetos de estudio. Aunque no se encontraron diferencias significativas en porcentaje y activación de la población de linfocitos B en pacientes con DCL, estos presentaban una disminución de los niveles de IgG plasmáticos. En particular, tanto en la medida de la cadena ligera como en la pesada, vimos una disminución significativa en los pacientes con DCL con respecto a los controles: una disminución del  $60\pm 8\%$  ( $p < 0.01$ ) sobre los controles en el caso de la cadena ligera y una disminución significativa del  $75\pm 3\%$  sobre los controles en el caso de la cadena pesada ( $p < 0.01$ ) (Figura 35). Los pacientes con DCL presentaban también una disminución significativa con respecto a los pacientes sin DCL en la cadena pesada ( $p < 0.05$ ). En el caso de pacientes con NAFLD sin DCL, tanto en la cadena ligera ( $81\pm 7\%$  sobre los controles) como en la cadena pesada ( $91\pm 6\%$  sobre los controles), no se detectó ningún cambio significativo respecto al grupo control (Figura 35).



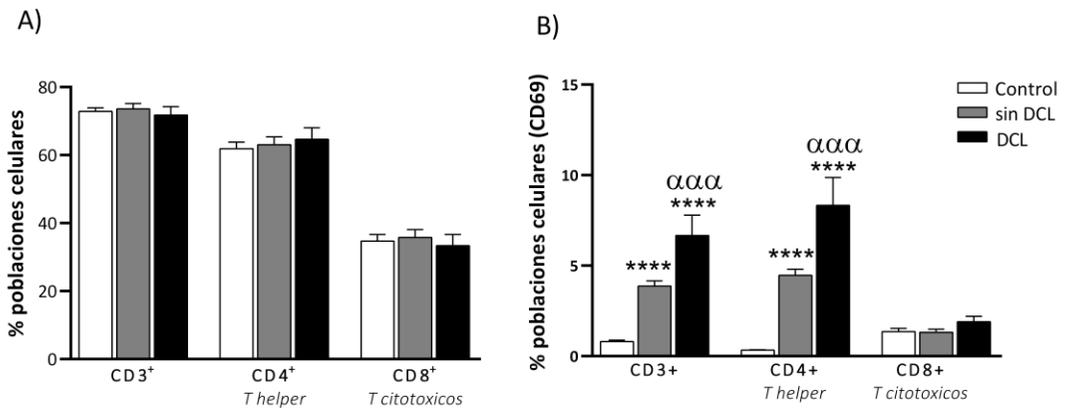
**Figura 35. Nivel de IgG en plasma de pacientes con NAFLD y controles.** Se representan los niveles de la cadena ligera y cadena pesada. Se muestra imagen representativa de *western blot* en parte superior de la gráfica. DCL: deterioro cognitivo leve. Las diferencias significativas con respecto al grupo control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ). ( $\alpha$ :  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ).

## Resultados

### 6.3 Linfocitos T

#### ➤ Poblaciones totales y activación

En el análisis de la población total de linfocitos T, no se observó diferencia alguna en las poblaciones totales de CD3<sup>+</sup>, ni en las proporciones de linfocitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>) y linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>). Sin embargo, el porcentaje de células positivas para el marcador de activación temprana CD69, dentro de las poblaciones de CD3<sup>+</sup> y de CD4<sup>+</sup>, aumentaba significativamente en los pacientes con NAFLD respecto al grupo control ( $p < 0,0001$ ) (Figura 35, Tabla 29). En particular, el aumento en ambas poblaciones fue significativamente mayor en los pacientes con DCL en comparación con los pacientes sin DCL ( $p < 0,001$ ). En cuanto a las células CD8<sup>+</sup> activadas no se observaron diferencias significativas en su activación entre los grupos estudiados (Figura 36, Tabla 29).



**Figura 36. Población de linfocitos T totales y su activación en pacientes con NAFLD y controles.** Se representa A) Porcentaje celular de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>), linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) dentro del total de leucocitos. B) Porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) dentro de la población. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM del siguiente número de individuos: Controles n = 29; pacientes sin DCL n = 32; pacientes con DCL n = 14. DCL: deterioro cognitivo leve. Las diferencias significativas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ). ( $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$ ;  $\alpha\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,0001$ ).

**Tabla 29. Linfocitos T totales y su activación en pacientes y controles.** Se indica el porcentaje poblacional y el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) dentro del total de linfocitos.

Linfocitos T	Control	Pacientes sin DCL	Pacientes con DCL	Valor global <i>p</i>
<b>% Poblacional (dentro del total de leucocitos)</b>				
CD3 <sup>+</sup>	72,81 ± 1,08	73,55 ± 1,61	71,74 ± 2,50	0,7772
CD4 <sup>+</sup>	61,93 ± 1,89	63,04 ± 2,31	64,63 ± 3,37	0,7829
CD8 <sup>+</sup>	34,70 ± 1,95	35,80 ± 2,28	33,39 ± 3,22	0,8120
<b>% Células activadas (células CD69<sup>+</sup> dentro de la población)</b>				
CD3 <sup>+</sup>	0,80 ± 0,08	3,87 ± 0,28 ****	6,67 ± 1,12 ****/§§§	<0,0001
CD4 <sup>+</sup>	0,33 ± 0,03	4,47 ± 0,34 ****	8,33 ± 1,54 ****/§§§	<0,0001
CD8 <sup>+</sup>	1,36 ± 0,18	1,32 ± 0,16	1,90 ± 0,30	0,1549

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos \*. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con §. (§§§: *p*<0,001; \*\*\*\*: *p*<0,0001).

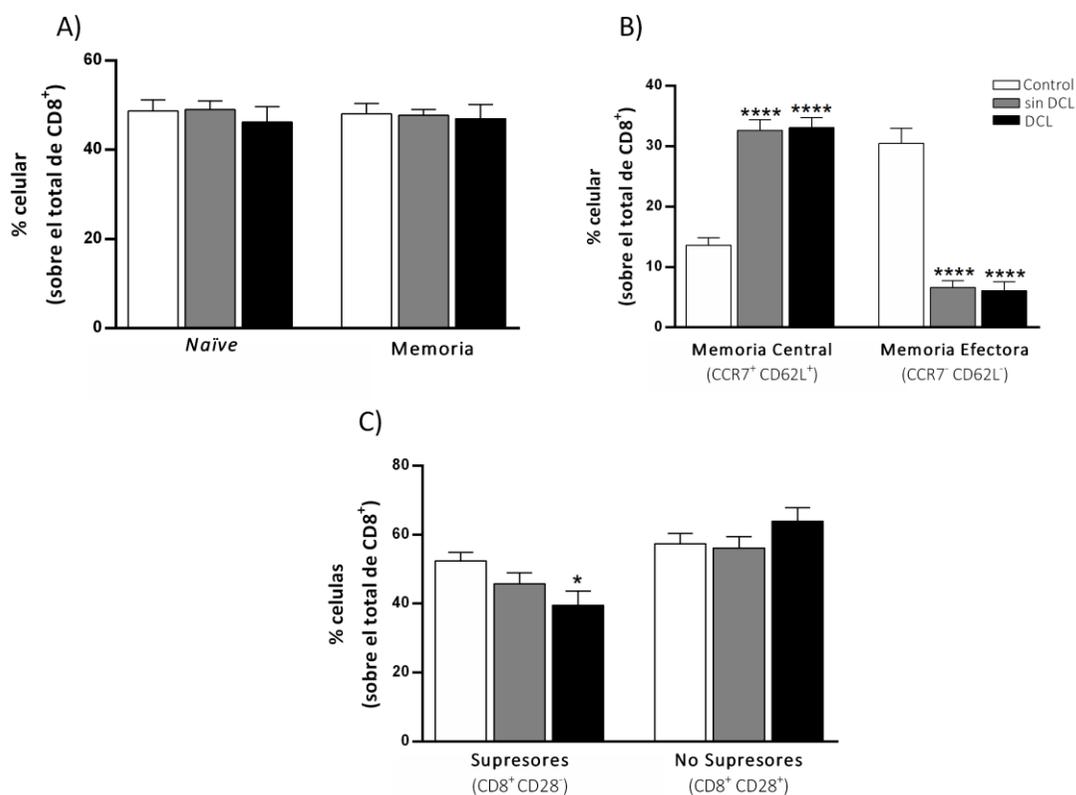
### ➤ Subpoblaciones linfocitos T CD8<sup>+</sup> y activación

Para un análisis más profundo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, examinamos la distribución de los linfocitos *naïve* y los de memoria, según van perdiendo la proteína de membrana CD45RA y van adquiriendo el CD45RO. No observamos diferencia en el porcentaje de los CD8 *naïve* y de memoria, entre pacientes con NAFLD y los controles (Figura 37A, Tabla 30). Además, estudiamos las diferentes subpoblaciones de linfocitos de memoria, tanto los de memoria central (CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) como los de memoria efectora (CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>). Los pacientes con NAFLD mostraban un aumento significativo de la proporción de células de memoria central y paralelamente una disminución significativa de las células de memoria efectora con respecto al grupo control (Figura 37B, Tabla 30). Por último, estudiamos la población de linfocitos CD8 respecto a la presencia o ausencia de la proteína de membrana CD28. Los linfocitos CD8 negativos para CD28 se denominan linfocitos T supresores, y tienen una función prevalentemente reguladora, en vez de citotóxica como la mayoría de los CD8<sup>+</sup>. Los pacientes con DCL presentaban un porcentaje significativamente menor de población supresora con respecto a los controles (*p*<0.05). En concordancia, existe un aumento, pero

## Resultados

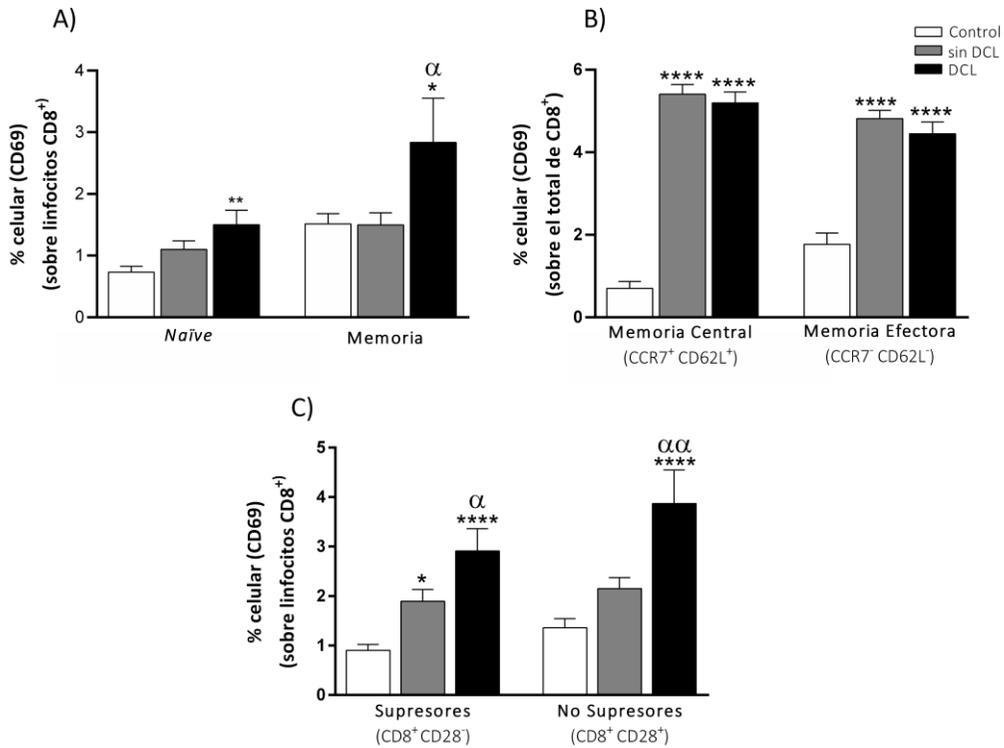
sin diferencias significativa, en los pacientes con DCL en la población de CD8 positivos para CD28 (Figura 37C, Tabla 30).

También para las subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos medimos el marcador de activación temprana CD69. Observamos que el porcentaje de células positivas para CD69, dentro de las poblaciones de CD8 *naïve* y de memoria, estaba aumentado de forma selectiva en los pacientes con DCL con respecto a los controles. En particular se observa un aumento exclusivo en el porcentaje de las células de memoria activadas en los pacientes con DCL con respecto a pacientes sin DCL (Figura 38A, Tabla 30). En general, los pacientes con NAFLD, mostraban una mayor proporción de linfocitos CD8<sup>+</sup> activados de memoria central y efectora, con diferencias significativas respecto a los sujetos sanos (Figura 38B, Tabla 30). El aumento en la activación fue significativamente mayor en los linfocitos CD8 supresores y no supresores de pacientes con DCL, con respecto a los controles y pacientes sin DCL (Figura 38C, Tabla 30).



**Figura 37. Subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos en pacientes con NAFLD y controles.** Se representan los porcentajes sobre el total de linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>): A) Porcentaje celular de los linfocitos CD8 *naïve* y de memoria, B) Porcentaje celular de los linfocitos CD8 de memoria central y memoria efectora, C) Porcentaje celular de los linfocitos CD8 supresores y no supresores (CD28<sup>-/+</sup>). Los valores se representan como la media ± EEM del siguiente número de individuos: Controles n = 29; pacientes sin DCL n = 32; pacientes con DCL n = 14. Las diferencias significativas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). (\*: p<0,05; \*\*\*\*: p<0,001).

## Resultados



**Figura 38. Activación de linfocitos T citotóxicos en pacientes con NAFLD y controles.** Se muestra el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) de cada población dentro del total de la población estudiada: A) Porcentaje celular de los linfocitos CD8 *naïve* y de memoria, B) Porcentaje celular de los linfocitos CD8 de memoria central y memoria efectora, C) Porcentaje celular de los linfocitos CD8 supresores y no supresores (CD28<sup>-/+</sup>). Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM del siguiente número de individuos: Controles n = 29; pacientes sin DCL n = 32; pacientes con DCL n = 14. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ). (\*/ $\alpha$ : p<0,05; \*\*/ $\alpha\alpha$ : p<0,01; \*\*\*\*: p<0,0001).

**Tabla 30. Subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos y su activación en los tres grupos de estudio.** Se indica el porcentaje poblacional y el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) dentro del total de linfocitos T CD8<sup>+</sup>

Población	Control	Pacientes sin DCL	Pacientes con DCL	Valor global <i>p</i>
<b>% Poblacional (sobre el total de CD8<sup>+</sup>)</b>				
CD8 <sup>+</sup> <i>naïve</i>	48,65 ± 2,59	49,04 ± 1,94	46,23 ± 3,39	0,7652
CD8 <sup>+</sup> memoria	48,01 ± 2,39	47,72 ± 1,30	46,99 ± 3,15	0,9563
CD8 <sup>+</sup> CM	13,60 ± 1,26	32,63 ± 1,74 ****	33,06 ± 1,65 ****	<0,0001
CD8 <sup>+</sup> EM	30,44 ± 2,51	6,60 ± 1,16 ****	6,07 ± 1,47 ****	<0,0001
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	52,38 ± 2,50	45,75 ± 3,20	39,55 ± 4,15 *	0,0456
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	57,40 ± 2,96	56,13 ± 3,23	63,94 ± 3,94	0,3384
<b>% Células activadas (células CD69<sup>+</sup> dentro de la población)</b>				
CD8 <sup>+</sup> <i>naïve</i>	0,73 ± 0,09	1,10 ± 0,14	1,50 ± 0,23 **	0,0108
CD8 <sup>+</sup> memoria	1,52 ± 0,16	1,50 ± 0,19	2,84 ± 0,71 */§	0,0131
CD8 <sup>+</sup> CM	0,70 ± 0,16	5,41 ± 0,24 ****	5,20 ± 0,27 ****	<0,0001
CD8 <sup>+</sup> EM	1,77 ± 0,27	4,82 ± ****	4,45 ± 0,29 ****	<0,0001
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,90 ± 0,12	1,90 ± 0,24 *	2,9 ± 0,45 *****/§	<0,0001
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	1,36 ± 0,18	2,15 ± 0,22	3,87 ± 0,67 *****/§§	<0,0001

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve, CM, memoria central; EM, memoria efectora. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos\*. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con §. (\*/§:  $p < 0,05$ ; \*\*/§§:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*\*/§§§:  $p < 0,0001$ ).

### ➤ Subpoblaciones linfocitos T CD4<sup>+</sup> y activación.

Para el estudio de las subpoblaciones de los CD4<sup>+</sup> *helper*, medimos los mismos parámetros analizados en la población de CD8<sup>+</sup>.

Los pacientes con DCL mostraron un porcentaje significativamente mayor de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria que los sujetos de control y los pacientes sin DCL. En paralelo, el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* se redujo significativamente en los pacientes con DCL respecto a los pacientes sin DCL. Por tanto, se observa un desplazamiento desde la población de linfocitos CD4<sup>+</sup> *naïve* hasta la población de memoria, exclusivo en pacientes NAFLD con deterioro cognitivo leve (Figura 39A, Tabla 31).

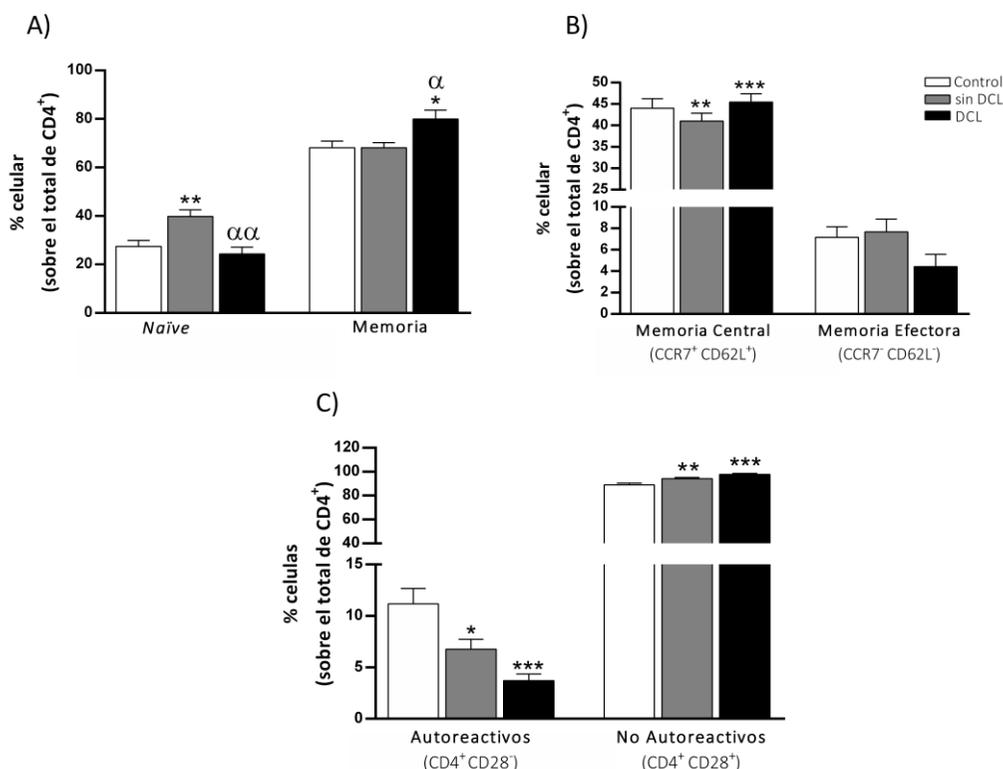
## Resultados

Cuando analizamos la distribución de los linfocitos de memoria, observamos diferencias significativas en las células de memoria entre pacientes y controles, particularmente una mayor proporción de linfocitos de memoria central en los pacientes con DCL y una disminución en los de pacientes sin DCL. No se observó ningún cambio significativo en la distribución de los linfocitos de memoria efectora en los grupos de estudio (Figura 39B, Tabla 31). La mayoría de los linfocitos  $CD4^+$  son  $CD28^+$  y requieren la exposición a  $CD28$  para ser activados. Algunos linfocitos  $CD4^+$  carecen de  $CD28$  ( $CD4^+CD28^-$ ) y se consideran autorreactivos, ya que tienen la capacidad de activarse sin la molécula co-estimuladora. En los pacientes con DCL y sin DCL la proporción de linfocitos  $CD4^+CD28^-$  fue significativamente menor que en los controles. El porcentaje de linfocitos T no autorreactivos ( $CD4^+CD28^+$ ) aumentó en paralelo en pacientes sin y con DCL en comparación con los controles (Figura 39C, Tabla 31).

En cuanto al marcador de activación temprano  $CD69$ , tanto las poblaciones *naïve* como las de memoria de  $CD4^+$  de los pacientes con NAFLD, expresaron niveles más altos de células positivas a  $CD69$  en comparación con los controles. Además, los pacientes con DCL mostraron mayor activación que los pacientes sin DCL en ambas poblaciones celulares (Figura 40A, Tabla 31).

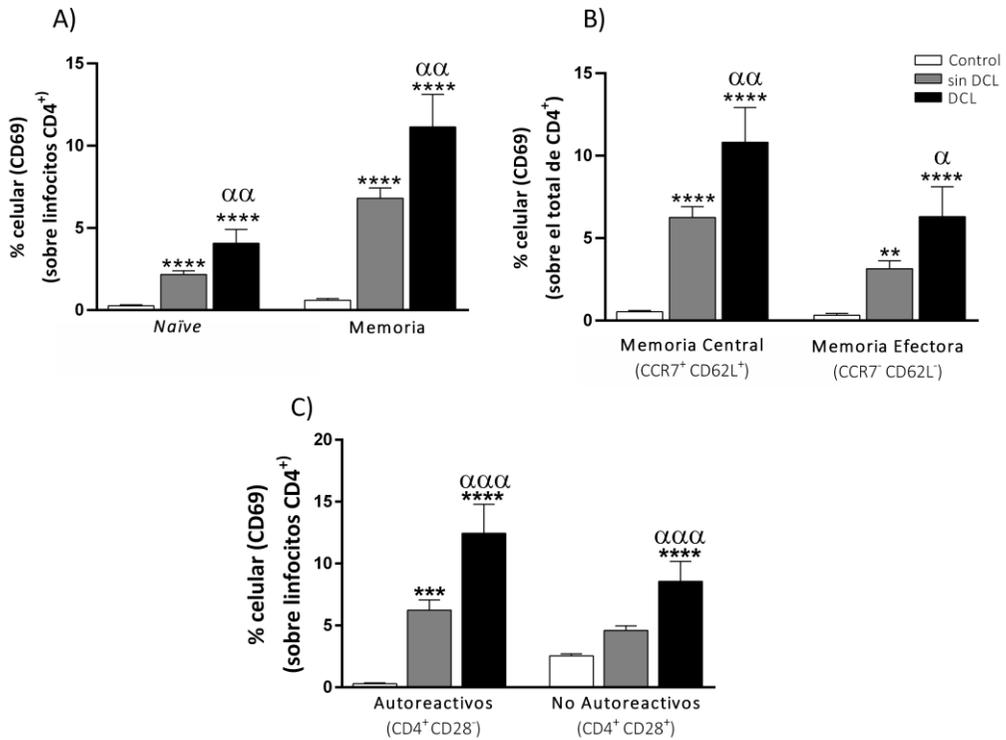
Asimismo, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células activadas en las poblaciones de memoria, tanto de memoria central como efectora, en los pacientes con NAFLD respecto a los controles, siendo significativamente mayor en los pacientes con DCL en comparación con los pacientes sin deterioro cognitivo (Figura 40B, Tabla 31).

Los pacientes con NAFLD, en comparación con los controles, mostraron un aumento significativo en la expresión de  $CD69$  en células autorreactivas, pero solo los pacientes con DCL mostraron un aumento de activación en las células no autoreactivas en comparación con los controles. Además, tanto las células autorreactivas como las no autoreactivas se activaron más en el grupo con DCL que en el grupo sin DCL (Figura 40C, Tabla 31). En resumen, los resultados indican una activación general de los linfocitos T  $CD4^+$  y sus subpoblaciones en pacientes con DCL (Figura 40, Tabla 31).



**Figura 39. Subpoblaciones de linfocitos T helper en pacientes con NAFLD y controles.** Se representan los porcentajes sobre el total de linfocitos T helper (CD4<sup>+</sup>): A) Porcentaje celular de los linfocitos CD4 naive y de memoria, B) Porcentaje celular de los linfocitos CD4 de CM y EM, C) Porcentaje celular de los linfocitos CD4 autoreactivos y no autoreactivos (CD28<sup>-/+</sup>). Los valores se representan como la media ± EEM del siguiente número de individuos: Controles n = 29; pacientes sin DCL n = 32; pacientes con DCL n = 14. CM, memoria central; EM, memoria efectora. Las diferencias significativas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias con respecto al grupo sin DCL se representan con (α). (\*/α: p<0,05; \*\*/αα: p<0,01; \*\*\*/ααα: p<0,001).

## Resultados



**Figura 40. Activación de linfocitos T helper en pacientes con NAFLD y controles.** Se muestra el porcentaje de células activadas (CD69+) de cada población dentro del total de la población estudiada: A) Porcentaje celular de los linfocitos CD4 naïve y de memoria, B) Porcentaje celular de los linfocitos CD4 de memoria central y efectora, C) Porcentaje celular de los linfocitos CD4 autoreactivos y no autoreactivos (CD28<sup>+/+</sup>). Los valores se representan como la media ± EEM del siguiente número de individuos: Controles n = 29; pacientes sin DCL n = 32; pacientes con DCL n = 14. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ). ( $\alpha$ : p<0,05; \*\*/ $\alpha\alpha$ : p<0,01; \*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$ : p<0,001; \*\*\*\*: p<0,0001).

**Tabla 31. Subpoblaciones de linfocitos T *helper* y su activación en los tres grupos de estudio.** Se indica el porcentaje poblacional y el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) dentro del total de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Población	Control	Pacientes sin DCL	Pacientes con DCL	Valor global <i>p</i>
<b>% Poblacional (sobre el total de CD4<sup>+</sup>)</b>				
CD4 <sup>+</sup> <i>naïve</i>	27,47 ± 2,37	39,80 ± 2,77 **	24,26 ± 2,85 §§	<b>0,0005</b>
CD4 <sup>+</sup> memoria	68,11 ± 2,72	68,09 ± 2,12	79,93 ± 3,67 */§	<b>0,0275</b>
CD4 <sup>+</sup> CM	44,05 ± 2,20	41,00 ± 1,87	45,48 ± 1,93	0,3235
CD4 <sup>+</sup> EM	7,16 ± 1,00	7,67 ± 1,20	4,41 ± 1,16	0,2115
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	11,18 ± 1,48	6,76 ± 0,96 *	3,71 ± 0,64 ***	<b>0,0007</b>
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	88,97 ± 1,48	94,16 ± 0,96 **	97,72 ± 0,84 ***	<b>&lt;0,0001</b>
<b>% Células activadas (células CD69<sup>+</sup> dentro de la población)</b>				
CD4 <sup>+</sup> <i>naïve</i>	0,27 ± 0,07	2,17 ± 0,23 ****	4,06 ± 0,84 ****/§§	<b>&lt;0,0001</b>
CD4 <sup>+</sup> memoria	0,61 ± 0,10	6,81 ± 0,62 ****	11,14 ± 1,97 ****/§§	<b>&lt;0,0001</b>
CD4 <sup>+</sup> CM	0,54 ± 0,07	6,26 ± 0,65 ****	10,82 ± 2,11 ****/§§	<b>&lt;0,0001</b>
CD4 <sup>+</sup> EM	0,32 ± 0,11	3,14 ± 0,47 **	6,31 ± 1,81 ****/§	<b>&lt;0,0001</b>
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,29 ± 0,06	6,23 ± 0,83 ****	12,44 ± 2,35 ****/§§§	<b>&lt;0,0001</b>
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	2,54 ± 0,15	4,60 ± 0,37	8,57 ± 1,61 ****/§§§	<b>&lt;0,0001</b>

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos\*. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con §. (\* / §: *p* < 0,05; \*\* / §§: *p* < 0,01; \*\*\* / §§§: *p* < 0,001; \*\*\*\*: *p* < 0,0001).

## 7 Estudio de la diferenciación de los distintos subtipos de linfocitos CD4<sup>+</sup>

Dependiendo de las citocinas a las que se exponen durante la estimulación antigénica, los CD4<sup>+</sup> se convierten en linfocitos T efectoros (Th, *T helper*, por sus siglas en inglés). Analizamos los distintos subtipos de linfocitos efectoros y reguladores, caracterizados por la expresión de factores de transcripción específicos y la secreción de ciertas citocinas.

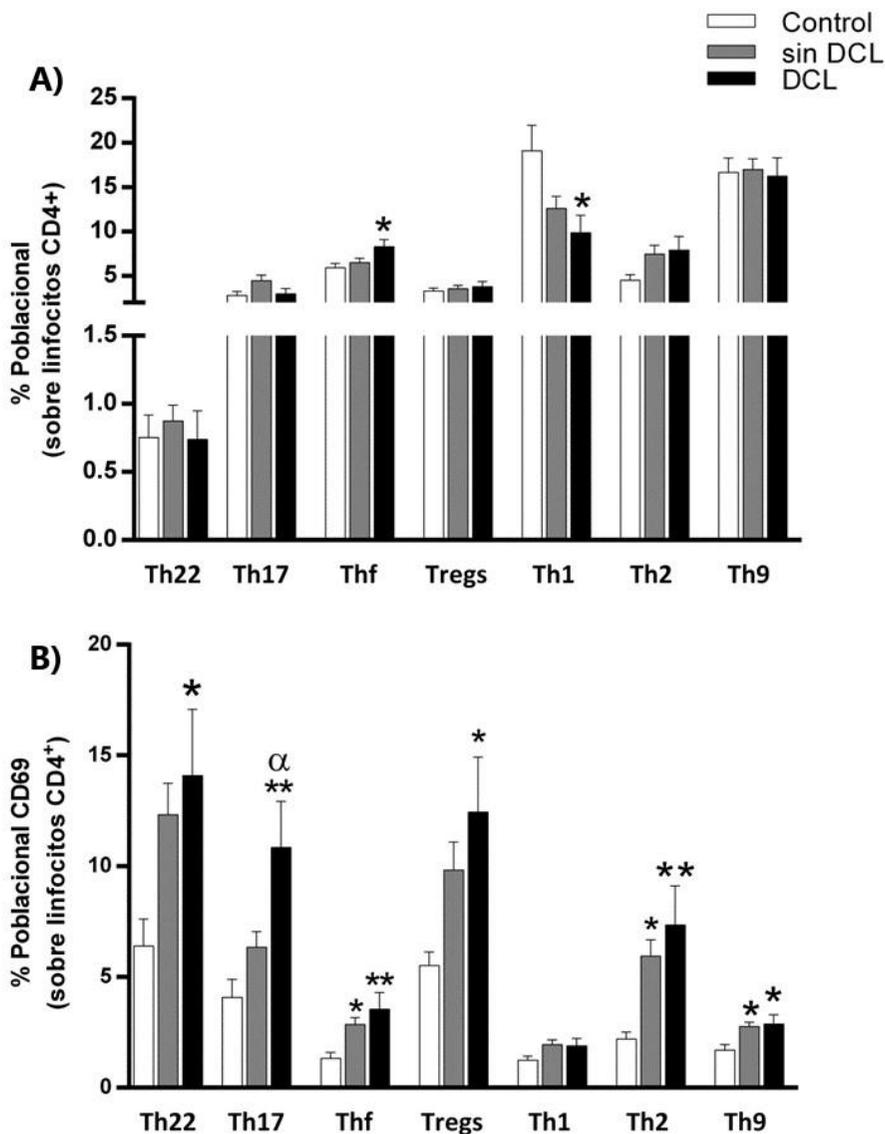
## Resultados

### 7.1 Análisis de los subtipos de los linfocitos T efectores mediante citometría de flujo

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse en distintos subtipos: los linfocitos Th2 y las células T reguladoras (Tregs), que actúan con función antiinflamatoria, mientras que las células Th1, Th17, Th 22 y Th9 presentan una función principalmente proinflamatoria.

Los pacientes con DCL presentaron un aumento significativo en el porcentaje de los linfocitos Thf y una disminución del porcentaje de células Th1 en comparación con los controles (Figura 41A, Tabla 32). No se encontraron diferencias significativas en las otras subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores entre los grupos de estudio (Figura 41A, Tabla 32).

En cuanto a la activación, aunque no había diferencias en el porcentaje de células Th17, la expresión de CD69 aumentó en células Th17 de pacientes con DCL en comparación con los pacientes sin DCL y los controles (Figura 41B, Tabla 32). Los dos grupos de pacientes con NAFLD presentaron un mayor porcentaje de células positivas para CD69 que los controles, con una diferencia significativa en la activación de Th22, Thf, Th2, Tregs y Th9. No existían diferencias significativas entre los grupos de estudio en el porcentaje de las células Th1 activadas (Figura 41B, Tabla 32).



**Figura 41.** Poblaciones de los subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y su activación con el marcador CD69. A) Porcentaje celular de los subtipos de linfocitos T *helper*: Th22, Th17, Thf, Tregs, Th1, Th2 y TH9; B) Porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) de cada población dentro del total de la población estudiada. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM del siguiente número de individuos: Controles n = 14; pacientes sin DCL n = 26; pacientes con DCL n = 12. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ). (\*/ $\alpha$ : p<0,05; \*\*/ $\alpha\alpha$ : p<0,01).

## Resultados

Tabla 32. **Porcentaje poblacional de los subtipos de linfocitos T helper y su activación en PBMC aisladas de los tres grupos de estudio.** Se indica el porcentaje poblacional y el porcentaje de células activadas (CD69<sup>+</sup>) dentro del total de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

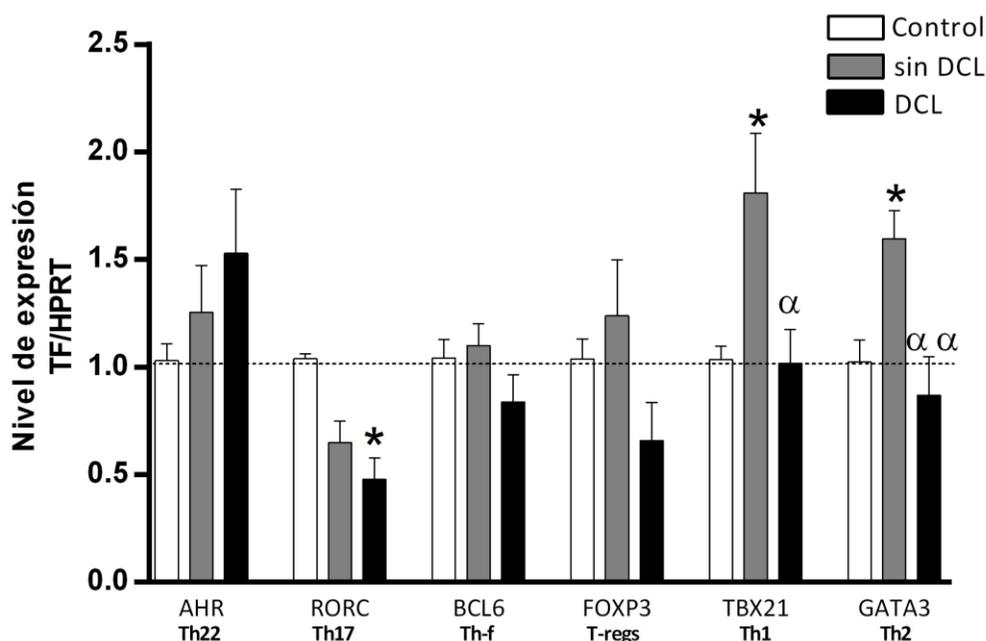
<i>Población</i>	<b>Control</b>	<b>Pacientes sin DCL</b>	<b>Pacientes con DCL</b>	<b>Valor global <i>p</i></b>
<b>% Poblacional (sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup>)</b>				
<b>Th22</b>	0,75 ± 0,16	0,87 ± 0,21	0,74 ± 0,21	0,7614
<b>Th17</b>	2,80 ± 0,44	4,44 ± 0,64	2,96 ± 0,63	0,1114
<b>Thf</b>	5,90 ± 0,52	6,51 ± 0,48	8,30 ± 0,83 *	0,0383
<b>Tregs</b>	3,29 ± 0,33	3,57 ± 0,35	3,80 ± 0,60	0,7685
<b>Th1</b>	19,08 ± 2,86	12,59 ± 1,34	9,86 ± 2,00 *	0,0134
<b>Th2</b>	4,50 ± 0,63	7,43 ± 1,01	7,90 ± 1,53	0,0829
<b>Th9</b>	16,64 ± 1,62	16,98 ± 1,22	16,22 ± 2,10	0,9454
<b>% Células activadas (células CD69<sup>+</sup> dentro de la población)</b>				
<b>Th22</b>	6,39 ± 1,21	12,33 ± 1,41	14,09 ± 2,98 *	0,0275
<b>Th17</b>	4,076 ± 0,81	6,34 ± 0,71	10,84 ± 2,08 **/\$	0,0017
<b>Thf</b>	1,33 ± 0,26	2,86 ± 0,30 *	3,53 ± 0,76 **	0,0071
<b>Tregs</b>	5,51 ± 0,61	9,83 ± 1,26	12,44 ± 2,48 *	0,0428
<b>Th1</b>	1,24 ± 0,18	1,95 ± 0,22	1,88 ± 0,34	0,1036
<b>Th2</b>	2,18 ± 0,32	5,95 ± 0,73 *	7,34 ± 1,76 **	0,0062
<b>Th9</b>	1,69 ± 0,24	2,76 ± 0,20 *	2,87 ± 0,42 *	0,0121

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos \*. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con \$. (\*/\$: p<0,05; \*\*: p<0,01).

## 7.2 Análisis de la expresión de los factores de transcripción

Analizamos, mediante RT-qPCR, la expresión del ARN mensajero en PBMC de los factores de transcripción AHR, RORC, BCL6, FOXP3, TBX21 y GATA3, específicos de los subtipos de linfocitos Th22, Th17, Thf, T reguladoras, Th1 y Th2 respectivamente (ver apartado 11, Materiales y métodos). La expresión del factor de transcripción AHR, específico para los linfocitos Th22, mostró una tendencia a aumentar en pacientes con DCL

en comparación con el grupo control y sin DCL ( $p=0.1123$  y  $p=0.1501$ , respectivamente), pero sin diferencias significativas (Figura 42). El factor de transcripción RORC, característico de las células Th17, se redujo significativamente en comparación con el grupo control ( $p<0,05$ ) (Figura 42). TBX21 y GATA3, específicos para los linfocitos Th1 y Th2, respectivamente, disminuyeron significativamente ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$  respectivamente) en los pacientes con DCL en comparación con los pacientes sin DCL. Los pacientes sin deterioro cognitivo presentaron una mayor expresión de los factores TBX21 y GATA3 que el grupo control ( $p<0.05$ ). No se encontraron diferencias para FOXP3 y BCL6, marcadores de Tregs y Thf (Figura 42).



**Figura 42 . Análisis de la expresión de factores de transcripción característicos para diferentes subconjuntos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.** A) Análisis de la expresión ARNm de los factores de transcripción AHR, RORC, BCL6, FOXP3, TBX21 y GATA3 en PBMC (células mononucleares periféricas de la sangre). Los niveles de expresión se han normalizado mediante el gen endógeno HPRT y se expresan en relación con el nivel de expresión del grupo control, que se considera como 1. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM del siguiente número de individuos: Controles  $n = 17$ ; pacientes sin DCL  $n = 16$ ; pacientes con DCL  $n = 17$ . Las diferencias significativas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias significativas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ). (\*/ $\alpha$ :  $p<0,05$ ;  $\alpha\alpha$ :  $p<0,01$ ).

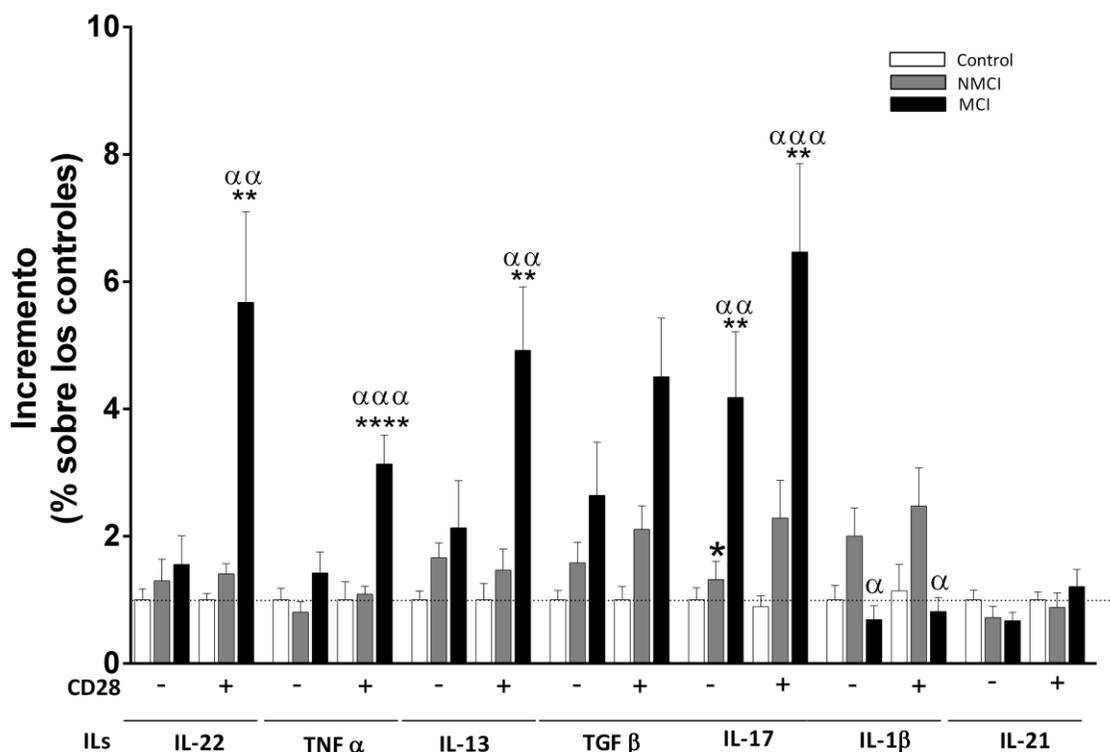
## Resultados

### 7.3 Análisis de citocinas secretadas *in vitro* en cultivos de células T CD4<sup>+</sup>

Los subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se caracterizaron mejor tras la incubación de los CD4<sup>+</sup> aislados en ausencia o presencia de CD28 añadido y analizando las citocinas secretadas a medio de cultivo (ver apartado 10.1 y 10.2, Materiales y métodos).

En general, no se observaron cambios significativos en las citocinas liberadas de pacientes sin DCL en comparación con los controles, mientras que se observó un aumento marcado de varias citocinas en los pacientes NAFLD con deterioro cognitivo leve (Figura 43, Tabla 33).

Específicamente, en pacientes con DCL, cuando añadimos en los cultivos el coestimulador CD28, detectamos un aumento significativo de TNF $\alpha$  en comparación con las células CD4<sup>+</sup> de los controles y los pacientes sin DCL ( $p < 0,001$ ). TFG $\beta$  aumentó en cultivos de pacientes con DCL en ausencia y presencia de CD28, pero el aumento fue significativo solo tras activación con CD28 con respecto a los pacientes sin DCL. Tanto en condiciones basales como de activación, los cultivos de pacientes con DCL mostraron un aumento significativo de IL-17 que no se detectaba en los otros grupos de estudio (Figura 43, Tabla 33). Se detectaron mayores niveles de IL-22 e IL-13 tras la activación con CD28 en cultivos de pacientes con DCL en comparación con pacientes sin DCL y controles ( $p < 0,01$ ). La cuantificación de los niveles de IL-21 en los sedimentos celulares obtenidos a partir de los cultivos de células CD4<sup>+</sup> se realizó mediante la técnica de western blot (ver apartado 10.2). No se encontraron diferencias para IL-21 e IL-1 $\beta$  en pacientes con DCL en comparación con los controles. Sin embargo, los pacientes sin DCL mostraron un aumento significativo de la liberación de IL-1 $\beta$  tanto en condiciones basales como en presencia del coestimulador respecto a los pacientes con DCL ( $p < 0,05$ ) (Figura 43, Tabla 33).



**Figura 43. Niveles de citocinas secretadas *in vitro* en cultivos de células T CD4<sup>+</sup> en ausencia (-) o presencia (+) de CD28.** Los valores se expresan normalizados en relación con los controles considerados como 1 para facilitar la identificación de alteraciones en pacientes sin DCL y con DCL. Los valores se representan como la media ± EEM del siguiente número de individuos: Controles n = 12; pacientes sin DCL n = 13; pacientes con DCL n = 12. Las diferencias significativas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con (α). (\* / α: p < 0,05; \*\* / αα: p < 0,01; \*\*\* / ααα: p < 0,001; \*\*\*\* / αααα: p < 0,0001).

## Resultados

**Tabla 33. Niveles de citocinas secretadas *in vitro* en cultivos de células T CD4<sup>+</sup> en ausencia (-) o presencia (+) de anti-CD28.**

Citocinas (pg/mL)	Control	Pacientes sin DCL	Pacientes con DCL	Valor global <i>p</i>
<b>IL-22</b>				
-	271,3 ± 45,85	352,1 ± 92,46	421,6 ± 121,8	0,1767
+	40,19 ± 3,92	56,52 ± 6,43	228,0 ± 57,35***/§	<b>0,0065</b>
<b>TNF α</b>				
-	66,15 ± 11,79	53,04 ± 11,04	93,97 ± 21,69	0,1673
+	118,0 ± 33,22	128,3 ± 14,76	369,9 ± 53,13****/§§§	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IL-13</b>				
-	7,67 ± 1,06	12,74 ± 1,77	16,37 ± 5,65	0,2471
+	1,08 ± 0,27	1,58 ± 0,36	5,30 ± 1,08***/§§	<b>0,005</b>
<b>TGF β</b>				
-	62,65 ± 9,00	98,98 ± 20,39	165,4 ± 52,18	0,1767
+	61,55 ± 12,66	88,31 ± 16,84	167,2 ± 41,50	0,0524
<b>IL-17</b>				
-	5,81 ± 1,10	7,68 ± 1,65	31,15 ± 8,86***/§§	<b>0,0018</b>
+	6,01 ± 0,92	13,72 ± 3,55	38,84 ± 8,36***/§§	<b>0,0003</b>
<b>IL-1 β</b>				
-	0,88 ± 0,20	1,78 ± 0,39	0,61 ± 1,01 §	0,0198
+	1,01 ± 0,36	2,19 ± 0,53	0,72 ± 0,20 §	<b>0,0377</b>

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores significativamente diferentes con respecto a los controles se indican con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con (§). (§ p < 0.05; \*\*/§§ p < 0.01; \*\*\*/§§§ p < 0.001; \*\*\*\*; p < 0.0001).

## 8 Estudio de la concentración de citocinas en el plasma

Analizamos un amplio patrón de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en plasma de pacientes con NAFLD y controles. Generalmente observamos un aumento de los niveles de citocinas, tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, en los dos grupos de pacientes con respecto al grupo control.

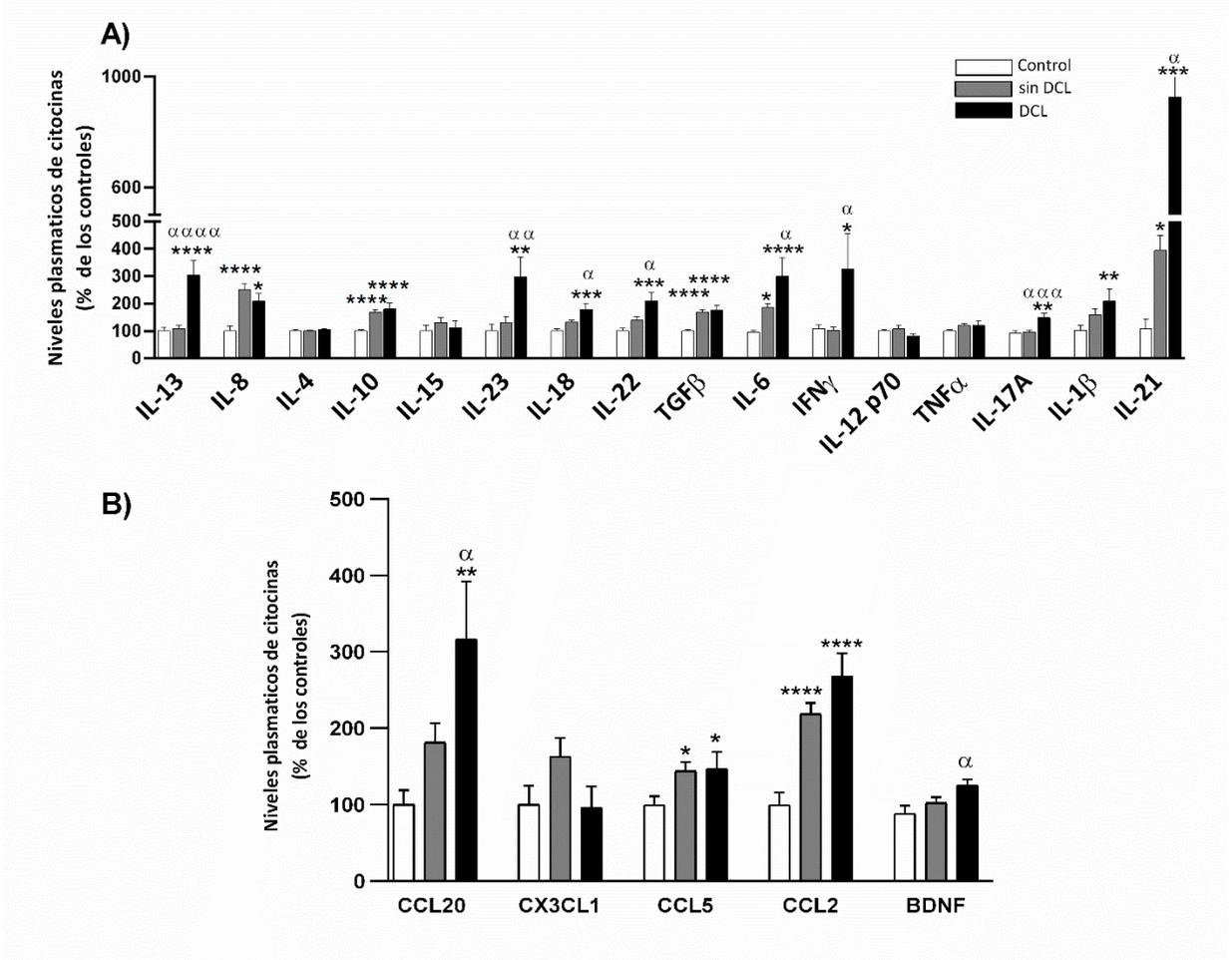
Sin embargo, en la mayoría de las citocinas analizadas, el aumento era mayor o exclusivo en pacientes con DCL (Figura 44A-B). La concentración plasmática de cada citocina en los diferentes grupos se muestra en la Tabla 34.

Los niveles de ciertas citocinas, **IL-13, IL-23, IL-18, IL-22, IL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-21** y de **CCL20** fueron significativamente mayores en los pacientes con DCL que en los otros grupos analizados.

El nivel en plasma de **BDNF** estaba significativamente aumentado en los pacientes con DCL con respecto al grupo sin DCL. Los pacientes sin DCL presentaban concentraciones de **IL-6** e **IL-21** significativamente mayores que el grupo control. Además, los pacientes con NAFLD, con y sin DCL, mostraron un aumento significativo de **IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ , CCL2** y **CCL5** con respecto al grupo control (Figura. 44A-B, Tabla 34). En cuanto a la concentración plasmáticas de **IL-1 $\beta$**  el aumento, en comparación con el grupo control, fue significativo solo en pacientes con DCL.

No se encontraron diferencias en los niveles plasmáticos de **IL-4, IL-15, IL 12 p-70, TNF- $\alpha$**  y **CX3CL1** entre los pacientes y el grupo control. (Figura. 44A-B, Tabla 34).

## Resultados



**Figura 44. Niveles plasmáticos de diferentes citocinas y quimiocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en pacientes con NAFLD y controles (A-B)** Los niveles plasmáticos de las citocinas indicadas se expresan como porcentaje de controles para facilitar la identificación de alteraciones en pacientes sin DCL y con DCL. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM del siguiente número de individuos: Controles  $n = 30$ ; pacientes sin DCL  $n = 49$ ; pacientes con DCL  $n = 22$ . Las diferencias estadísticas con respecto al grupo control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ) (\*/ $\alpha$   $p < 0.05$ ; \*\*/ $\alpha\alpha$   $p < 0.01$ ; \*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha$   $p < 0.001$ ; \*\*\*\*/ $\alpha\alpha\alpha\alpha$   $p < 0.0001$ ).

Tabla 34. Niveles plasmáticos de citocinas de control y pacientes.

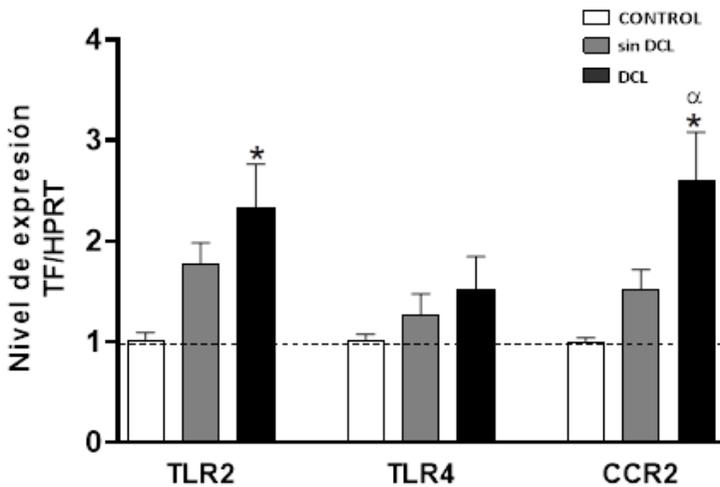
Citocinas (pg/mL)	Control	Pacientes sin DCL	Pacientes con DCL	Valor global <i>p</i>
<b>IL-13</b>	3,6 5 ± 0,47	3,98 ± 0,4	11,09 ± 2,02****/§§§§	<0,0001
<b>IL-17A</b>	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,28 ± 0,03**/§§§	0,0007
<b>IFN <math>\gamma</math></b>	0,22 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,62 ± 0,24*/§	0,0114
<b>IL-6</b>	1,59 ± 0,11	2,81 ± 0,20*	4,10 ± 0,81****/§	<0,0001
<b>IL-18</b>	144,9 ± 12,1	190,8 ± 11,7	258,7 ± 32,3****/§	0,0002
<b>IL-10</b>	3,20 ± 0,16	5,39 ± 0,31****	5,75 ± 0,72****	<0,0001
<b>IL-22</b>	200,0 ± 18,8	276,9 ± 27,0	418,5 ± 64,5****/§	0,0014
<b>TGF <math>\beta</math></b>	4759 ± 243,3	8038 ± 416,0****	8351 ± 832,4****	<0,0001
<b>IL-8</b>	7,34 ± 1,30	18,43 ± 1,64****	15,28 ± 2,06*	<0,0001
<b>IL-15</b>	4,68 ± 1,01	6,12 ± 0,90	5,24 ± 1,13	0,5753
<b>IL-23</b>	11,55 ± 2,97	14,91 ± 2,60	34,22 ± 8,50**/§§	0,0026
<b>IL-12 p70</b>	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,2364
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	5,45 ± 0,22	6,48 ± 0,42	6,54 ± 0,94	0,1186
<b>IL-4</b>	65,98 ± 2,34	64,87 ± 2,13	68,39 ± 2,14	0,5108
<b>IL-21</b>	8,23 ± 2,30	30,98 ± 4,27*	62,45 ± 19,57****/§	0,0007
<b>IL-1 <math>\beta</math></b>	2,21 ± 0,37	3,69 ± 0,48	4,94 ± 0,99**	0,0104
<b>CCL5</b>	7352 ± 830	10605 ± 848*	11625 ± 1539*	0,0154
<b>CX3CL1</b>	490 ± 122	799 ± 117	517 ± 141	0,1686
<b>CCL20</b>	8,21 ± 1,57	14,90 ± 1,08	26,01 ± 6,18**/§	0,0022
<b>CCL2</b>	5,13 ± 0,82	11,51 ± 0,79****	12,69 ± 1,50****	<0,0001
<b>BDNF</b>	1942 ± 159,4	1994 ± 143,5	2624 ± 165,7 §	0,0253

Los valores se expresan como media ± EEM (error estándar de media). Los resultados se analizaron con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Tukey. DCL: deterioro cognitivo leve. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos\*. Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con (§). (\*/§ p < 0.05; \*\*/ §§ p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\*/§§§§ p < 0.0001).

## Resultados

### 9 Expresión génica de receptores de membrana en PBMC

Se analizó, mediante RT-qPCR, la expresión de ARN mensajeros para TLR2, TLR4, CCR2 en PBMC. El análisis de la expresión de ARN mensajero se normalizó en base al grupo control, donde su expresión se considera 1. El nivel de expresión del ARN mensajero de CCR2 estaba significativamente aumentado de forma exclusiva en pacientes con DCL, con respecto al grupo control y a los pacientes sin DCL ( $p < 0,05$ ) (Figura 45). En cuanto a los TLRs, analizamos la expresión de TLR2 y TLR4 como sensores de los dos grupos de bacterias Gram<sup>+</sup> y Gram<sup>-</sup>, respectivamente. La expresión de TLR2 aumentaba en los pacientes con DCL con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ) y en TLR4 no había diferencias significativas entre los grupos de estudio (Figura 45).



**Figura 45. Análisis de la expresión de ARNm de los receptores TLR2, TLR4 y CCR2 en PBMC** (células mononucleares periféricas de la sangre). Los niveles de expresión se han normalizado mediante el gen endógeno HPRT y se expresan en relación con el nivel de expresión del grupo control, que se considera como 1. Los valores se representan como la media  $\pm$  EEM del siguiente número de individuos: Controles  $n = 17$ ; pacientes sin DCL  $n = 16$ ; pacientes con DCL  $n = 17$ . Las diferencias estadísticas con respecto al grupo Control se representan con asteriscos (\*). Las diferencias estadísticas con respecto al grupo sin DCL se representan con ( $\alpha$ ). ( $\alpha: p < 0,05$ ).

## 10 Estudio de la capacidad predictiva de los parámetros inmunológicos analizados para el diagnóstico del deterioro cognitivo en NAFLD

### 10.1 Análisis de correlaciones entre los parámetros inmunológicos y las alteraciones cognitivas y motoras

Se realizó un análisis de correlaciones bivariadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson entre los diferentes parámetros inmunológicos estudiados y los resultados obtenidos en los test psicométricos que evalúan las funciones cognitivas y motoras en los pacientes con NAFLD.

#### 10.1.1 Alteraciones cognitivas

##### ➤ Atención selectiva y velocidad de procesamiento

En las Tablas 35 y 36 se muestran las correlaciones estadísticamente significativas entre los parámetros inmunológicos estudiados y los resultados de los test *Stroop*, de claves oral y las pruebas de Dígitos y símbolos, Conexión numérica A y B incluidas en la batería PHES que evalúan la atención selectiva y velocidad de procesamiento (Tablas 35 y 36). Existen correlaciones significativas entre los niveles plasmáticos de algunas citocinas con las funciones de atención y velocidad de procesamiento en nuestro grupo de pacientes. Los niveles elevados de IL-17A y CCL20 se asocian con peores resultados en la tarea incongruente del test *Stroop*, parámetro que evalúa la flexibilidad cognitiva e inhibición mental, dadas las correlaciones negativas obtenidas (Tabla 35). Se observan correlaciones con coeficiente negativo entre las concentraciones de IL-13, IL-17A e IL-6 y el número total de ítem y de aciertos del test de clave oral. Además, un mayor número de fallos se correlaciona con una mayor concentración de las citocinas proinflamatorias IL17A, IFN- $\gamma$ , IL-18, IL-22 y IL-1 $\beta$ , y CCL5. Por lo tanto, el ambiente proinflamatorio está asociado con el deterioro de la atención y velocidad de procesamiento en estos pacientes. Un número

## Resultados

inferior de acierto en la prueba de Dígitos y símbolos de la batería PHES, que evalúa tanto la atención y la velocidad de procesamiento como la memoria de trabajo, correlacionaban niveles mayores de IL-17A. Por otra parte, encontramos correlaciones positivas entre las pruebas de Conexión numérica A y B y ciertas citocinas proinflamatorias (IL-17A, IL-18 y IL-21) y antiinflamatorias (IL-13 y IL-10), es decir, un mayor tiempo en realizar la tarea se correlaciona con niveles más elevados de citocinas (Tabla 36). El porcentaje de monocitos intermedios, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, proinflamatorios y el de monocitos no inflamatorios clásicos, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, correlacionan con el número de errores cometidos, específicamente, los monocitos proinflamatorios correlacionan positivamente y los no inflamatorios negativamente. Por lo tanto, la mayor proporción de los monocitos proinflamatorios y la proporción reducida de los no inflamatorios se relacionan con un número mayor de fallos cometidos en la prueba de claves oral (Tabla 35). La expresión aumentada del receptor CCR2 se correlaciona con una peor ejecución del test de clave oral, de todas las pruebas de la batería PHES y con un número inferior de ítems realizados en la tarea incongruente del test de *Stroop* (Tablas 35 y 36). No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre los porcentajes totales de linfocitos T y B y el deterioro en la capacidad de atención selectiva, sin embargo, la proporción de linfocitos T activados, tanto CD3<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, se correlacionan negativamente la tarea neutra del test de *Stroop*, mientras que la proporción de linfocitos B activados se correlaciona positivamente con el resultado de errores obtenido en el test de claves oral (Tabla 35). Analizando las correlaciones de las diferentes subpoblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup>, observamos que a mayor porcentaje de linfocitos de memoria y menor de linfocitos *naïve*, los pacientes realizan peor todas las pruebas de atención. La proporción de células CD4<sup>+</sup> *naïve* activadas se correlaciona negativamente con el número total y de aciertos en el test de claves oral y positivamente con los resultados obtenidos en la prueba de Conexión numérica A (Tablas 35 y 36). También una mayor proporción de linfocitos CD4<sup>+</sup> autorreactivos (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) y no autorreactivos (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) activados se correlaciona con un peor resultado en cuanto a los aciertos de estas pruebas y el tiempo empleado para finalizar las pruebas de PHES. Por otra parte, los linfocitos citotóxicos supresores (CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) se correlacionan con una peor ejecución de la prueba de Conexión numérica A (Tablas 35 y 36). Por último, encontramos correlaciones entre los parámetros inmunológicos estudiados para el estudio de la

diferenciación de los distintos tipos de CD4<sup>+</sup> y los resultados obtenidos en los test que evalúan las funciones de atención selectiva y velocidad de procesamiento (Tablas 35 y 36).

**Tabla 35. Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los test que evalúan la atención selectiva y velocidad de procesamiento (Test Stroop y Test de claves oral)**

Parámetros	Test Stroop			Test de clave oral		
	Tarea congruente	Tarea neutra	Tarea incongruente	Total ítems	Aciertos	Errores
IL-13				-0,280*	-0,260*	
IL-17A			-0,390**	-0,319*	-0,357*	0,289*
IFN $\gamma$				-0,412*	-0,453**	0,483**
IL-6				-0,272*		
IL-18						0,335*
IL-22						0,439**
IL-8	0,358*	0,358*				
IL-12 p70		0,388*				
IL-1 $\beta$						0,524**
CCL5						0,351*
CCL20			-0,306*			
BCL6						-0,395*
GATA3	0,386*			0,522**	0,552**	
TBX21	0,422*			0,437*	0,453*	
RORC				0,376*		
FOXP3				0,437*	0,442*	
CCR2			-0,417*	-0,579**	-0,565**	0,491*
TLR2						0,397*
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> (clásicos)						-0,335*
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> (intermedio)						0,357*
Plasmoblastos						0,407*
Linfocitos B (CD69 <sup>+</sup> )						0,372*
Transicional B (CD69 <sup>+</sup> )				0,359*		
Inmaduros B (CD69 <sup>+</sup> )				0,390*	0,352*	
Unswitched B (CD69 <sup>+</sup> )						0,356*
Linfocitos T CD3 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	-0,302*	-0,356*				
Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )		-0,348*				
CD8 <sup>+</sup> EM (CD69 <sup>+</sup> )						0,301*
CD4 <sup>+</sup> naïve	0,334*	0,363*		0,379**	0,379**	
CD4 <sup>+</sup> memoria	-0,411**	0,400**	-0,318*	-0,375*	-0,357*	
Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )		-0,348*				
CD4 <sup>+</sup> naïve (CD69 <sup>+</sup> )				-0,438**	-0,425**	
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	-0,391**		-0,338*	-0,567**	-0,554**	
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )		-0,345*				
Tregs	-0,553*					
Th17						0,444*

Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson de las correlaciones estadísticamente significativas. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

## Resultados

**Tabla 36. Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los subtest de la batería PHES que evalúan la atención selectiva y velocidad de procesamiento.**

Parámetros	Atención selectiva y velocidad de procesamiento		
	PHES		
	Dígitos y símbolos	Conexión numérica A	Conexión numérica B
<b>IL-13</b>		0,308*	0,306*
<b>IL-17A</b>	-0,453**	0,594**	0,469**
<b>IL-18</b>		0,322*	0,333*
<b>IL-21</b>		0,524**	
<b>IL-10</b>		0,452**	
<b>GATA3</b>	0,523**		-0,438*
<b>RORC</b>		-0,392*	
<b>FOXP3</b>			-0,371*
<b>CCR2</b>	-0,475*	0,471*	0,444*
<b>TLR2</b>		0,373*	
<b>CD8<sup>+</sup> naïve</b>			-0,306*
<b>CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> (CD69<sup>+</sup>)</b>		0,325*	
<b>CD4<sup>+</sup> naïve</b>		-0,366*	-0,359*
<b>CD4<sup>+</sup> memoria</b>	-0,359*	0,409**	0,298*
<b>CD4<sup>+</sup> CM</b>		0,291*	
<b>CD4<sup>+</sup> naïve (CD69<sup>+</sup>)</b>		0,368*	
<b>CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> (CD69<sup>+</sup>)</b>	-0,355*	0,642**	0,507**

*Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson de las correlaciones estadísticamente significativas. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).*

Específicamente, la mayor proporción de las células Th17 y Tregs se correlaciona con una peor ejecución en cuanto a los fallos cometidos en el test de claves oral y aciertos en el test *Stroop*, respectivamente, aunque la expresión de sus factores característicos (RORC y FOXP3, respectivamente), nos indican una correlación de coeficiente positivo con los resultados total y de aciertos del test de clave oral y unas correlaciones negativas con las pruebas de Conexión numérica A y B (Tablas 35 y 36).

Asimismo, el factor de transcripción marcador de las células Th2, GATA 3, se correlaciona positivamente con los aciertos de la prueba Dígitos y símbolos y negativamente con los resultados obtenidos en las pruebas de Conexión numérica A y B, mientras que la expresión del factor de transcripción específico de las células Th22, BCL6, se correlaciona negativamente con los errores en claves oral (Tablas 35 y 36).

### ➤ **Atención selectiva-sostenida y concentración mental**

En la Tabla 37 se muestran las correlaciones estadísticamente significativas entre los parámetros inmunológicos estudiados y los resultados de las puntuaciones del test d2 utilizado para evaluar la atención selectiva-sostenida y la concentración mental. En general, como vimos para la atención selectiva y velocidad de procesamiento, el ambiente proinflamatorio, debido al aumento de las concentraciones de varias citocinas proinflamatorias, está relacionado con el deterioro en la atención selectiva-sostenida y concentración mental en estos pacientes. También en el test del d2, los niveles elevados de la citocina antiinflamatoria, IL-13, se correlacionan negativamente con las puntuaciones de todos los parámetros evaluados, y positivamente con el número de fallos cometidos (Tabla 37). La expresión del ARN mensajero de los receptores CCR2, TLR2 y TLR4 se correlaciona positivamente con el número de fallos cometidos y negativamente con las puntuaciones obtenidas en los aciertos totales y en los parámetros TOT y CON, índice de efectividad y concentración respectivamente (Tabla 37). Asimismo, la mayor proporción de monocitos proinflamatorios en estos pacientes se correlaciona con un mayor número de omisiones cometidas.

## Resultados

**Tabla 37. Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los test que evalúan la atención selectiva-sostenida y concentración mental.**

Parámetros	Atención selectiva-sostenida y concentración mental					
	Test d2					
	Total de respuestas	Total de aciertos	Omisiones	Comisiones	TOT <sup>Δ</sup>	CON <sup>ΔΔ</sup>
IL-13	-0,429**	-0,344**		0,269*	-0,422**	-0,421**
IL-17A	-0,300*	-0,337*			-0,296*	-0,340*
IFN- $\gamma$	-0,444**	-0,500**		0,469**	-0,503**	-0,476**
IL-6	-0,293*	-0,273*			-0,332*	-0,332*
IL-12 p70					0,401*	
IL-21				0,409*		
GATA3	0,527**	0,568**		-0,462*	0,508*	0,541**
RORC				-0,377*		
FOXP3		0,380*				
CCR2		-0,558**	0,630**			-0,487*
TLR2			0,669**			
TLR4			-	0,677**	-0,415*	
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>			0,324*			
Transicional B (CD69 <sup>+</sup> )			-			0,350*
Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )			-0,331*			
CD8 <sup>+</sup> memoria (CD69 <sup>+</sup> )			-0,334*			
CD8 <sup>+</sup> CM (CD69 <sup>+</sup> )			-0,322*			
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )			-0,337*			
CD4 <sup>+</sup> naïve	0,342*	0,330*				
CD4 <sup>+</sup> memoria	-0,385**	-0,413**				-0,344*
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,378*	0,361*	0,314*		0,336*	0,380*
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	-0,398**	-0,393**	-		-0,313*	-0,411**
Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )			-0,331*			
CD4 <sup>+</sup> naïve (CD69 <sup>+</sup> )		-0,324*				
CD4 <sup>+</sup> memoria (CD69 <sup>+</sup> )			-0,355*			
CD4 <sup>+</sup> CM (CD69 <sup>+</sup> )			-0,341*			
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	-0,548**	-0,563**		0,400**		-0,458**
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )			-0,319*			
Th2 (CD69 <sup>+</sup> )				0,554*		
Th22 (CD69 <sup>+</sup> )				0,461*		

Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson de las correlaciones estadísticamente significativas. (\*p<0,05; \*\* p<0,01). <sup>Δ</sup> índice de efectividad; <sup>ΔΔ</sup> índice de concentración.

En el análisis de las correlaciones de las subpoblaciones de los linfocitos T CD4, observamos que una mayor activación linfocitaria por el paso de los linfocitos *naïve* a memoria, se relaciona con un déficit en la atención sostenida-selectiva y concentración mental (Tabla 37). Específicamente, el mayor porcentaje de células CD4 de memoria, y el menor porcentaje de CD4<sup>+</sup> *naïve* se correlaciona con un menor número de respuestas totales y aciertos; además, a mayor proporción de células de memoria peor puntuación en el índice de concentración (CON) (Tabla 37). Sin embargo, en presencia del marcador de activación

temprana CD69, el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> *naïve* se correlaciona negativamente con el número total de aciertos, y el porcentaje de células T de memoria, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, se correlaciona negativamente con el número total de omisiones cometidos en la prueba de d2 (Tabla 37). Además, la activación de linfocitos T, CD4 y CD8, presenta correlaciones con coeficiente negativo con el número de omisiones realizados en estos pacientes (Tabla 37). El mayor porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> autorreactivos activados y el menor porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> no autorreactivos activados se relacionan, también, con un deterioro en la atención selectiva-sostenida y concentración mental. Finalmente, las células activadas Th2 y Th22, se relaciona con un mayor número de comisiones cometidas en los pacientes de estudio (Tabla 37).

### ➤ Memoria de trabajo

En la Tabla 38 se muestran los coeficientes de correlación estadísticamente significativos entre los parámetros inmunológicos estudiados y los resultados de las puntuaciones de los test de dígitos y test de letras y números orales, utilizado para evaluar la memoria de trabajo en nuestros pacientes.

Entre las citocinas analizadas, observamos que los elevados niveles plasmáticos de las interleucinas proinflamatorias IL-17A e IL-21 se correlacionan con una menor puntuación de los aciertos de dígitos inversos (Tabla 38). Por el contrario, la mayor proporción de monocitos no inflamatorios clásicos, y mayor expresión del factor de transcripción GATA3, propio de las células Th2, antiinflamatorias, se correlacionan con un número mayor de aciertos en dicho test. Además, la expresión aumentada del receptor CCR2 se correlaciona con un menor número de aciertos en el test de letras y números.

Por último, se observa que, un mayor porcentaje de células activadas, en particular de linfocitos B *naïve*, linfocitos B de memoria *unswitched*, linfocitos T CD8 de memoria efectora, linfocitos T CD4 *naïve* y los linfocitos T CD4 autorreactivos, se correlacionan con resultados peores en las pruebas que evalúan la memoria de trabajo (Tabla 38).

## Resultados

**Tabla 38. Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los test que evalúan la memoria del trabajo**

Memoria de trabajo			
Parámetros	Dígitos orales		Letras y números
	Dígitos directos (Aciertos)	Dígitos inversos (Aciertos)	Aciertos
IL-17A		-0,363*	
IL-21		-0,369*	
GATA3		0,484**	
RORC			0,363*
CCR2			-0,445*
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>		0,294*	
Naïve B (CD69 <sup>+</sup> )	-0,357*		
Unswitched B (CD69 <sup>+</sup> )		0,347*	
CD8 <sup>+</sup> EM (CD69 <sup>+</sup> )	0,498**		
CD4 <sup>+</sup> EM			-0,358*
CD4 <sup>+</sup> naïve (CD69 <sup>+</sup> )		-0,336*	-0,299*
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (CD69 <sup>+</sup> )		-0,365*	-0,381**

Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson de las correlaciones estadísticamente significativas. (\*p<0,05; \*\* p<0,01).

### 10.1.2 Alteraciones motoras

En la Tabla 39 se muestran los coeficientes de correlación estadísticamente significativos entre los parámetros estudiados y los resultados de los test utilizados para evaluar las alteraciones motoras, el test de coordinación bimanual, el test de coordinación visuo-motora y las pruebas de puntos seriados y línea quebrada incluidas en la batería PHES.

En general, observamos que algunos parámetros inmunológicos proinflamatorios y antiinflamatorios están relacionados con un déficit de la coordinación motora en los pacientes con NAFLD. Algunas citocinas proinflamatorias (IL-17A, IL-21, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8 y CCL20) se correlacionan positivamente con un mayor tiempo empleado en la realización de todas las pruebas de coordinación, pero, especialmente, en la visuo-motora y línea quebrada (Tabla 39). Por otra parte, componentes antiinflamatorios, como los factores de transcripción GATA3 y FOXP3, específicos de las células Th2 y Tregs, respectivamente, presentan correlaciones negativas con los resultados obtenidos, es decir, una menor expresión de estos parámetros se correlaciona con un tiempo mayor empleado en la

realización de las tareas. Sin embargo, los niveles altos de citocinas antiinflamatorias, como IL-13 y IL-10, se correlacionan con resultados peores en las pruebas de coordinación (Tabla 39).

Además, se encontraron correlaciones de coeficiente positivo entre algunas subpoblaciones de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los resultados de las pruebas de coordinación. En particular, los peores resultados de todas las pruebas analizadas se correlacionan con un mayor porcentaje de células activadas CD4<sup>+</sup> autorreactivas (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) (Tabla 39).

**Tabla 39. Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación de los test que evalúan las alteraciones motoras**

Parámetros	Alteraciones motoras			
	Coordinación		PHES	
	Bimanual (min)	Visuo-motora (min)	Puntos seriados	Línea quebrada
IL-13	0,244*	0,259*		
IL-10				0,471**
IL-17A		0,443**	0,348*	0,357*
IL-21				0,421*
IFN-γ		0,412*		0,483**
IL-6		0,343**		0,394**
IL-8			0,305*	
CCL20		-0,267*	0,289*	
GATA3		-0,354*		
FOXP3	-0,364*			
CCR2	0,470*	0,557*		
TLR2				0,423*
B Inmaduros (CD69 <sup>+</sup> )	-0,424**			
Linfocitos T CD3 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	0,294*	0,355*		
Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )		0,322*		
CD8 <sup>+</sup> naïve (CD69 <sup>+</sup> )	-0,320*			
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	0,313*			
CD8 <sup>+</sup> CD28 (CD69 <sup>+</sup> )	0,322*	0,363*		
Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )		0,322*	-0,309*	
CD4 <sup>+</sup> naïve (CD69 <sup>+</sup> )	0,313*	0,379**		
CD4 <sup>+</sup> memoria (CD69 <sup>+</sup> )		0,324*		
CD4 <sup>+</sup> CM (CD69 <sup>+</sup> )		0,349*		
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	0,527**	0,503**	0,407**	0,494**
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )		0,309*		
Thf (CD69 <sup>+</sup> )		0,432*		

Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson de las correlaciones estadísticamente significativas. (\*p<0,05; \*\* p<0,01).

## Resultados

### 10.2 Análisis de correlaciones entre los parámetros analizados y el diagnóstico del deterioro cognitivo leve mediante la nueva puntuación

Se llevó a cabo un estudio estadístico de correlaciones bivariadas, con coeficiente de correlación de Spearman, entre los diferentes parámetros analizados durante esta tesis y la puntuación utilizada para el diagnóstico del deterioro cognitivo leve en nuestros pacientes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 40.

**Tabla 40. Correlación bivariada de los parámetros estudiados con la puntuación utilizada para el diagnóstico de DCL.**

Coeficientes de correlación de Spearman		
Parámetros	Puntuación DCL	<i>p</i> valor
CAP	0,296*	0,037
Plaquetas	-0,298*	0,019
Albumina	0,366**	0,004
IL-10	-0,328**	0,008
IL-6	-0,306**	0,006
CCL5	-0,332*	0,012
CCL20	-0,225*	0,037
IL-13	-0,417**	0,000
IL-17A	-0,348**	0,004
CCL2	-0,257*	0,031
GATA3	0,429**	0,008
RORC	0,388*	0,026
CCR2	-0,452*	0,018
CD3 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	-0,345*	0,019
CD4 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	-0,254*	0,039
CD8 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	-0,308*	0,037
CD4 <sup>+</sup> naïve (CD69 <sup>+</sup> )	-0,246*	0,046
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	-0,309*	0,012
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	-0,290*	0,022
Thf	-0,388*	0,037
Linfocitos B Inmaduros	0,334*	0,019
Linfocitos B Transicional	0,310*	0,030
Linfocitos B maduros	-0,387**	0,006
Linfocitos B Inmaduros (CD69 <sup>+</sup> )	0,282*	0,050
Linfocitos B Transicional (CD69 <sup>+</sup> )	0,400**	0,004

Se muestran el coeficiente de correlación y el valor *p* para las correlaciones de Spearman y el valor *p* de las correlaciones estadísticamente significativas. (\**p*<0,05; \*\* *p*<0,01).

Como podemos observar, gran parte de las citocinas, tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, muestran correlaciones significativas con coeficientes negativos. Además, la expresión de los factores de transcripción GATA3 y RORC presentaban coeficiente de correlación positivo, ya que existe una disminución en los pacientes.

Por otra parte, el receptor CCR2 presenta una correlación significativa y positiva con la nueva puntuación, Además, la proporción de linfocitos B inmaduros y transicionales correlacionan con coeficiente positivo y, paralelamente los linfocitos B maduros presentan una correlación negativa, aunque como hemos visto en apartados previos las medias poblacionales de estos parámetros no difieren entre pacientes con y sin DCL. La activación de algunas poblaciones también muestra una correlación significativa con la nueva puntuación (Tabla 40).

El siguiente paso, para comprobar la capacidad predictiva de los parámetros que correlacionan de manera significativa con la nueva puntuación, fue hacer un análisis de regresión logística univariante para cada población y a continuación hicimos un análisis multivariante con todos los parámetros significativos en el análisis anterior. Como se muestra en la Tabla 41, en el análisis univariante, el DCL en pacientes con NAFLD se asocia significativamente con los niveles de plaquetas en la sangre, niveles plasmáticos de IL-13, con la expresión del ARN mensajero del factor de transcripción GATA3, el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> activadas y células autorreactivas activadas (CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> CD69<sup>+</sup>), así como con el porcentaje de los linfocitos B inmaduros y transicionales (Tabla 41). El análisis de regresión logística multivariante, utilizando como variable dependiente la presencia de DCL y como variables independientes aquellas que fueron significativas en análisis univariante, muestra que solo la concentración de IL-13 se asoció significativamente con el DCL en pacientes con NAFLD (OR: 1,391; intervalo de confianza del 95%: 0,960-1,231; p = 0,021) (Tabla 41).

## Resultados

**Tabla 41. Análisis de regresión logística para evaluar la capacidad predictiva de los parámetros que contribuyen a la aparición del DCL en pacientes con NAFLD**

Análisis de regresión logística univariante		
Variable independiente	OR (95% CI)	<i>p</i> valor
CAP	0,992 (0,980-1,004)	0,195
Plaquetas	<b>1,010 (1,003-1,018)</b>	<b>0,008</b>
Albumina	0,274 (0,651-1,469)	0,131
IL-10	1,097 (0,783-1,538)	0,591
IL-6	1,000 (1,000-1,000)	0,081
CCL5	1,000 (1,000-1,001)	0,469
CCL20	1,020 (0,994-1,047)	0,132
IL-13	<b>1,368 (1,118-1,675)</b>	<b>0,002</b>
IL-17A	110,6 (0,65-18952)	0,07
CCL2	1,007 (0,879-1,154)	0,920
GATA3	<b>0,172 (0,041-0,724)</b>	<b>0,016</b>
RORC	0,143 (0,013-1,572)	0,112
CCR2	2,570 (0,999-6,616)	0,050
CD3 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	<b>1,338 (1,025-1,747)</b>	<b>0,032</b>
CD4 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	0,839(0,041-0,724)	0,328
CD8 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	1,172 (0,997-1,377)	0,055
CD4 <sup>+</sup> naïve (CD69 <sup>+</sup> )	1,116 (0,917-1,359)	0,272
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	<b>1,084 (1,002-1,173)</b>	<b>0,044</b>
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (CD69 <sup>+</sup> )	1,142 (0,987-1,322)	0,075
Thf	1,563 (0,888-2,752)	0,122
Linfocitos B Inmaduros	0,753 (0,549-1,034)	0,080
Linfocitos B Transicional	0,732 (0,516-1,040)	0,081
Linfocitos B maduros	1,287 (0,991-1,673)	0,059
Linfocitos B Inmaduros (CD69 <sup>+</sup> )	<b>0,862 (0,751-0,990)</b>	<b>0,035</b>
Linfocitos B Transicional (CD69 <sup>+</sup> )	<b>0,780 (0,641-0,949)</b>	<b>0,013</b>
Análisis logístico de regresión multivariante		
Variable independiente	OR (95% CI)	<i>p</i> valor
<b>IL-13</b>	1,391 (0,960-1,231)	0,021

La presencia de deterioro cognitivo leve (DCL) fue la variable dependiente en los análisis de regresión logística univariante y multivariante. Las variables independientes que resultaron significativas en el análisis univariante ( $p < 0.05$ , señaladas en negrita) fueron las utilizadas en el análisis multivariante. CI. intervalo de confianza; OR. odds ratio.

Por último, hicimos un análisis de la curva COR (Característica Operativa del Receptor) de la IL-13. A partir de este análisis calculamos el punto de corte, sensibilidad y especificidad de este parámetro para predecir la aparición del DCL en pacientes con NAFLD. El análisis de la curva COR de IL-13 para el diagnóstico de DCL en pacientes con NAFLD, mostró un valor de AUC (área bajo de la curva COR) de 0,804 (intervalo de confianza del 95%: 0,680-0,928;  $p < 0,0001$ ) (Figura 46). Para un punto de corte de 6,98 pg/ml. la especificidad fue del 83% y la sensibilidad del 68%. (Figura 46).

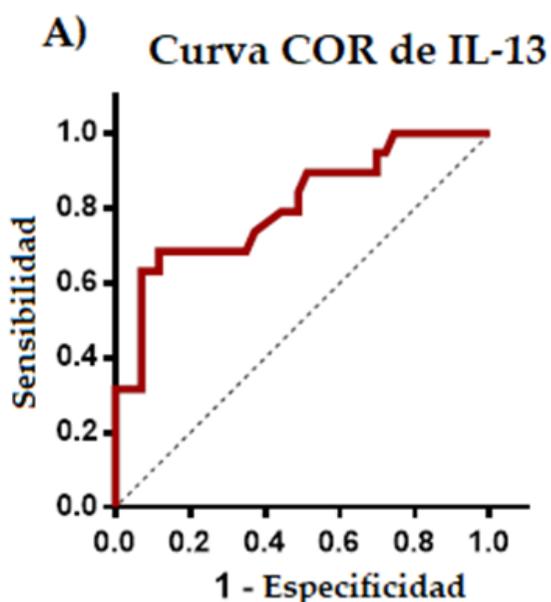


Figura 46. Curva de características operativas del receptor (COR) para determinar la sensibilidad y especificidad de IL-13 en el diagnóstico del deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD. El área bajo las curvas (AUC) fue 0,804 (intervalo de confianza (IC) del 95%; 0,680-0,928;  $p=0,0001$ ), La especificidad fue del 83% y la sensibilidad fue del 68% para un punto de corte de 6,98 pg/ml.



## **VI. Discusión**



## 1 Alteraciones cognitivas y motoras en pacientes NAFLD con DCL

En este trabajo de Tesis hemos demostrado que los pacientes con NAFLD pueden presentar deterioro cognitivo leve (DCL) antes de llegar a desarrollar cirrosis hepática.

En los últimos años, diferentes estudios han afirmado que el deterioro cognitivo leve podría ser una posible complicación asociada con la NAFLD, pero sin definir una metodología para caracterizar y detectar el deterioro cognitivo en estos pacientes.

Estudios recientes detectaron alteraciones en la atención, memoria y velocidad de procesamiento en sujetos con NAFLD (Seo et al, 2016; Weinstein et al, 2019). Los estudios de Celikbilek y Tuttolomondo encontraron déficits en las funciones ejecutivas y visuo-espacial utilizando las baterías de pruebas MoCA y MMSE (Celikbilek et al., 2018; Tuttolomondo et al., 2018). Un estudio de Elliott et al. examinó los síntomas cognitivos con 224 participantes con NAFLD y confirmaron la presencia de un deterioro funcional significativo que podría afectar a las actividades de la vida diaria de estos pacientes con NAFLD (Elliot et al, 2013).

En este trabajo de tesis, desarrollamos una nueva puntuación para diagnosticar el deterioro cognitivo en los pacientes con NAFLD, que es más sensible que la batería PHES, utilizada para detectar la EHM en pacientes cirróticos. Utilizando el PHES, cerca del 10% de los pacientes con NAFLD (7 de 73) fueron clasificados como con DCL. Esta prevalencia es menor que en los pacientes cirróticos, que muestran una prevalencia de EHM del 31-59% cuando se diagnostica con el PHES (Giménez-Garzó et al., 2017; Mangas-Losada et al., 2019; Romero-Gómez et al., 2007; Maldonado-Garza et al., 2011). Sin embargo, el PHES no es lo suficientemente sensible y no detecta la presencia de deterioro cognitivo leve en una proporción considerable de pacientes cirróticos (Giménez-Garzó et al., 2017). Existen otras pruebas psicométricas que evalúan diferentes aspectos de las funciones cognitivas y motoras, y pueden ser útiles para detectar el deterioro cognitivo (Giménez-Garzó et al., 2017; Felipo V et al, 2012; Butz M et al, 2010).

## Discusión

Hemos demostrado previamente que el test de claves oral, d2 y las pruebas de coordinación bimanual y visuo-motora fueron más sensibles que el PHES en la detección de estas alteraciones tempranas en pacientes cirróticos (Giménez-Garzó et al., 2017), lo que nos llevó a utilizar estas pruebas específicas para evaluar el DCL en pacientes con NAFLD.

Utilizando el criterio de la media  $\pm$  2DE (Sharma et al, 2010; Giménez-Garzó et al, 2017) las funciones neurológicas más afectadas en los pacientes con NAFLD del presente estudio, fueron la atención selectiva y la velocidad de procesamiento mental, evaluada por el número de aciertos totales obtenidos en el test de claves oral, que estaba deteriorada en el 32% de los pacientes, también la atención selectiva-sostenida, evaluada, en la prueba d2, por el parámetro TA (número total de aciertos), con una proporción de deterioro del 29% de los pacientes, y por último, la concentración, con deterioro en el 29% de los pacientes, evaluada según el parámetro de índice de concentración (CON) en el test d2 (ver apartado 1 de Resultados)

Para mejorar la identificación de los pacientes con NAFLD que presentan DCL, desarrollamos una nueva puntuación teniendo en cuenta el rendimiento de los pacientes en los tres parámetros con mayor proporción de deterioro: TA, CON del test d2 y las respuestas correctas en el test de claves oral. Los tres parámetros se corrigieron por edad según las tablas de normalidad de referencias. Como se describe en detalle en la sección 2 de Resultados, apartado 2.1, proseguimos con la asignación de una puntuación, obtenida según el método de Adam y Foley (Adams y Foley, 1952). Se considera que los pacientes que obtuvieron una puntuación inferior o igual de -5, tienen DCL. Por tanto, esta nueva puntuación clasificó a 22 de los 73 pacientes con NAFLD (30% de los pacientes) como pacientes con DCL, confirmando su mayor sensibilidad respecto el PHES en la detección del deterioro cognitivo en pacientes con NAFLD.

## **1.1 Alteraciones cognitivas en pacientes con NAFLD**

### **1.1.1 Atención selectiva y velocidad de procesamiento**

Para la evaluación de la atención selectiva y velocidad de procesamiento se utilizaron el test de Stroop y el test de Claves oral. Los pacientes con DCL obtuvieron peores resultados en ambas pruebas con respecto a los pacientes sin DCL y al grupo control.

Además de estas dos pruebas, también observamos que los pacientes con DCL obtuvieron peores resultados en varias de las pruebas psicométricas de la batería PHES, Dígitos y símbolos, Conexión numérica A y B, que evalúan la atención, la coordinación y la velocidad de procesamiento.

Estudios anteriores de nuestro grupo con pacientes cirróticos muestran que estas alteraciones cognitivas, aunque más exacerbadas en pacientes con EHM, también están presentes en pacientes cirróticos sin EHM. Por lo tanto, el hecho de que los pacientes sin EHM presenten un déficit en la atención y en la velocidad de procesamiento, indica que podrían ser alteraciones más tempranas en los pacientes cirróticos, conduciendo posteriormente a la EHM.

Por el contrario, los pacientes con NAFLD sin DCL no mostraron alteraciones en ninguna de las dos pruebas en comparación con el grupo de sujetos sanos.

### **1.1.2 Atención selectiva-sostenida y concentración mental**

Utilizando el test d2 evaluamos la atención selectiva y sostenida, la velocidad de exploración visual y concentración mental. Por atención selectiva se indica la capacidad de prestar atención a un determinado estímulo en presencia de otros estímulos que puedan distraer la atención. La atención sostenida se trata de la capacidad para mantener la atención y concentración en una actividad durante un largo periodo de tiempo. Los resultados obtenidos en este test indican un déficit en la atención selectiva-sostenida y de la

## **Discusión**

concentración solo en los pacientes con DCL con respecto a los otros grupos del estudio. No detectamos alteraciones en estas funciones cognitivas en los pacientes con NAFLD sin DCL con respecto al grupo control.

Es importante reconocer a tiempo estas alteraciones en los pacientes con NAFLD, ya que pueden afectar a la calidad de vida y dificultar la realización de actividades cotidianas como conducir un vehículo, donde es importante mantener una buena atención sostenida para reducir las situaciones de peligro.

Estudios previos han relacionado específicamente la EHM en pacientes cirróticos con una alteración directa en la capacidad de conducción, y esta alteración está asociada a déficits en atención y coordinación, con mayor incidencia de accidentes (Felipo et al, 2013; Bjaj et al, 2009).

### **1.1.3 Memoria de trabajo**

Los test de Dígitos y Letras y Números evalúan la memoria de trabajo, es decir, la capacidad que nos permite mantener en la mente los elementos que necesitamos para realizar una tarea mientras la estamos ejecutando. Los resultados de estos test indican que los pacientes con DCL tienen un déficit en la memoria de trabajo. En particular, tienen mayores dificultades para memorizar y recordar una serie de ítems, como números o letras, en comparación con los pacientes sin DCL y el grupo control.

Esto puede afectar a la vida diaria causando problemas de desorientación y olvido en los pacientes.

## **1.2 Alteraciones motoras**

Para analizar las alteraciones motoras de nuestros pacientes, utilizamos test de coordinación bimanual y visuo-motora. En ambas pruebas, los pacientes con DCL tardaron más tiempo en realizar la tarea que los pacientes sin DCL y el grupo de control. No encontramos alteraciones motoras en los pacientes con DCL. Estos resultados indican un déficit en la

coordinación bimanual y visuo-motora en pacientes con DCL, que pueden dificultar la realización de actividades cotidianas.

En resumen, en este estudio de tesis, confirmamos que los pacientes con NAFLD pueden presentar deterioro cognitivo leve antes de alcanzar la cirrosis hepática puesto que detectamos alteración de la atención selectiva-sostenida y concentración mental (test d2), alteración de la velocidad de procesamiento y flexibilidad cognitiva y control inhibitorio mental (test Stroop), un déficit en la atención selectiva y velocidad de procesamiento (test de clave oral), y deterioro en la atención verbal selectiva y la memoria de trabajo (test de dígitos y letras y números). Además, los pacientes con NAFLD muestran alteraciones motoras, en particular un deterioro en la coordinación, tanto bimanual como visuo-motora.

### **1.3 El daño hepático y el deterioro cognitivo leve**

La aparición del deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD no depende directamente del grado de enfermedad hepática. Según las puntuaciones NAS y FAST, clasificamos a los pacientes en función de su enfermedad hepática como NAFL (55%) y NASH (45%), y tanto la presencia como el grado de DCL fue similar entre ellos, sin observar diferencias significativas de desempeño en las diferentes pruebas psicométricas entre los dos grupos de pacientes. Además, comprobamos que la distribución de los pacientes NAFL y NASH, en los grupos de pacientes sin DCL y con DCL, era homogénea, sin algunas diferencias estadísticas significativas. Por esta razón todos los datos de los pacientes NAFLD se presentan se presentan clasificándolos según la presencia o no de DCL.

Por lo tanto, podemos confirmar que la aparición del DCL en los pacientes con NAFLD podría depender de otros factores adicionales al grado de enfermedad hepática.

Además, evaluamos si las comorbilidades podían influir en la prevalencia de DCL en pacientes con NAFLD. Los datos obtenidos mostraron que la diabetes aumentaba la prevalencia de DCL al doble (del 19% al 40%), mientras que el síndrome metabólico aumentaba 1.7 veces la prevalencia de DCL (del 21% al 36%). Igualmente, los datos mostraron un aumento de la prevalencia de DCL 1.5 veces en presencia de hipertensión (del

## Discusión

24% al 36%). La dislipidemia no parece tener una influencia significativa en la prevalencia del DCL en estos pacientes.

En un estudio previo de nuestro grupo, en pacientes con cirrosis hepática, encontramos que la aparición de la EHM no se correlacionaba con el grado de daño hepático, MELD o Child-Pugh, pero se asociaba a cambios específicos en el inmunofenotipo e inflamación periférica, ya que observamos que los pacientes cirróticos con EHM presentaban cambios más agravados o exclusivos respecto a los pacientes sin EHM (Mangas-Losada et al, 2017).

Aunque la prevalencia de deterioro cognitivo leve es similar entre pacientes con enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFL) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), así como entre pacientes cirróticos con diferentes grados de MELD o Child-Pugh, se ha observado que la progresión de la enfermedad hepática de la NAFLD a la cirrosis está asociada con un notable aumento en la prevalencia de DCL o EHM.

Como se mencionó anteriormente, la prevalencia de DCL detectada mediante el PHES es del 10% en NAFLD, pero es significativamente mayor (30-59%) en pacientes cirróticos. En términos de la prevalencia general de DCL, la nueva puntuación desarrollada clasifica al 30% de los pacientes con NAFLD como con DCL, con una prevalencia similar en pacientes con NAFL (59%) o NASH (41%). Si se aplica una puntuación similar, alrededor del 65% de los pacientes cirróticos serían diagnosticados con DCL (Giménez-Garzó et al, 2017). Estos datos indican que las diferencias en el grado de enfermedad hepática dentro de los pacientes con NAFL y NASH, o dentro de los pacientes cirróticos con Child-Pugh A o B, no afectan a la aparición o el grado de DCL/EHM. Sin embargo, la progresión de NAFLD a cirrosis claramente aumenta el riesgo de DCL, posiblemente debido a cambios en los procesos relacionados con la activación de DCL-EHM, como la inflamación, el inmunofenotipo o la neuroinflamación (Mangas-Losada et al, 2017; Balzano et al, 2018; Cabrera-Pastor et al, 2019)

Es interesante destacar que los pacientes con NAFLD y los pacientes cirróticos parecen tener diferentes patrones de funciones neurológicas afectadas. En particular, se ha observado que las dos funciones más afectadas en los pacientes cirróticos son la coordinación bimanual, con deterioro en el 51% de los pacientes, y la coordinación visuo-motora, con un

deterioro en el 43% de los pacientes (Giménez-Garzó et al, 2017). Sin embargo, estas funciones se ven afectadas en un porcentaje mucho menor de pacientes con NAFLD, sólo en el 11-14% de los casos.

Se ha demostrado que los pacientes con cirrosis tienen una mayor la prevalencia de deterioro cognitivo en comparación con los pacientes con NALFD, aunque las diferencias entre los dos grupos son relativamente pequeñas. En el caso del test d2, se ha encontrado que la concentración (CON) disminuye en el 49% de los pacientes cirróticos y en el 29% de los pacientes con NAFLD. Además, las respuestas totales (TR) y las respuestas corregidas (TA) del test d2 muestran alteraciones en el 51-54% de los pacientes cirróticos y en el 29% de los pacientes con NALFD (Giménez-Garzó et al, 2017).

Estos hallazgos sugieren que los efectos neurológicos de la enfermedad hepática pueden diferir según la etapa de la enfermedad hepática, las alteraciones cognitivas aparecen en las primeras fases de la enfermedad hepática crónica, mientras que el deterioro en la coordinación motora se desarrolla más tarde.

El deterioro cognitivo leve presente en pacientes con NAFLD presenta características muy similares al de la EHM en los pacientes con cirrosis hepática. Ambos afectan a funciones neurológicas similares y, como consecuencia, tienen un impacto similar en la capacidad para realizar tareas diarias que requieren atención y concentración.

Esto puede reducir la calidad de vida de los pacientes con NAFLD y aumentar su predisposición a una progresión hacia etapas más graves de deterioro cognitivo y motor.

Al igual que en los pacientes cirróticos con EHM, la detección temprana de DCL en pacientes con NAFLD permite tomar medidas que podrían revertir y/o prevenir la progresión de la disfunción neurológica, así como prevenir complicaciones asociadas y resultados adversos. La nueva puntuación desarrollada en este estudio será de gran utilidad en la práctica clínica para el diagnóstico del deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD.

### 2 Hiperamonemia e inflamación en pacientes con NAFLD

Los principales factores que contribuyen al desarrollo de la EHM en pacientes con cirrosis son la hiperamonemia y la inflamación (Shawcross et al., 2004; Montoliu et al., 2009; Felipo et al., 2012b). Recientemente, se ha demostrado que en la etapa inicial de la esteatosis simple también se produce una inhibición de la detoxificación del amonio a través del ciclo de la urea, lo que resulta en hiperamonemia (Lykke et al., 2019; Thomsen et al., 2014; De Chiara et al., 2018; Eriksen et al., 2019). Sin embargo, se sabe poco sobre la interacción entre el amonio y la disfunción cognitiva en la NAFLD.

En este estudio los pacientes con NAFLD presentan hiperamonemia con respecto a los sujetos sanos. No observamos diferencias significativas entre los niveles de amonio de los pacientes con y sin DCL.

En pacientes cirróticos se ha demostrado ampliamente que la inflamación agrava las alteraciones neurológicas producidas por la hiperamonemia (Shawcross et al., 2004).

En este estudio analizamos diferentes citocinas plasmáticas proinflamatorias y antiinflamatorias. Los niveles plasmáticos de las citocinas proinflamatorias IL-23, IL-18, IL-22, IL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-21 y CCL20 estaban aumentados en los pacientes con DCL, con respecto a los pacientes sin DCL, indicando la presencia de una respuesta inflamatoria sistémica en estos pacientes con DCL. Los niveles de la IL-6 y IL-21 estaban aumentados también en los pacientes sin DCL con respecto al grupo control. Por otro lado, observamos que los pacientes con DCL presentan niveles elevados de la citocina antiinflamatoria IL-13 y que estos niveles fueron predictivos del deterioro cognitivo en los pacientes con NAFLD. Los pacientes con NAFLD, con y sin DCL, mostraron un aumento significativo de IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ , CCL2 y CCL5. En cuanto a la concentración plasmática de IL-1 $\beta$  el aumento, en comparación con el grupo control, fue significativo solo en pacientes con DCL (Tabla 34).

Además, los niveles en plasma de las citocinas IL-10, IL-6, IL-13, IL17A, CCL2, CCL5 y CCL20 se correlacionan significativamente con el deterioro cognitivo leve, según la nueva

puntuación, confirmando que la inflamación es un factor importante en el desarrollo de las alteraciones neurológicas en pacientes con DCL.

Las correlaciones entre todos los parámetros inflamatorios estudiados y los resultados de las pruebas de atención, concentración, memoria de trabajo y coordinación motora descritas en este estudio aportan pruebas adicionales de la contribución de la inflamación al deterioro cognitivo y motor.

Los niveles plasmáticos de algunas citocinas se correlacionan negativamente con las funciones de atención y velocidad de procesamiento en nuestro grupo de pacientes. Por ejemplo, los niveles elevados de IL-17A y CCL20 se correlacionan negativamente con los resultados en la tarea incongruente (Test Stroop) que evalúa la flexibilidad cognitiva e inhibición mental. Además, se observan correlaciones negativas entre las concentraciones de IL-13, IL-17A e IL-6 y el número total de ítem y de aciertos del test de claves oral. Además, un mayor número de fallos se correlaciona con una mayor concentración de las citocinas proinflamatorias, IL17A, IFN- $\gamma$ , IL-18, IL-22 y IL-1 $\beta$ , y CCL5.

Además, observamos que el ambiente proinflamatorio está asociado con el deterioro de la atención selectiva-sostenida y concentración mental en estos pacientes, como indican las correlaciones con coeficiente negativo de ciertas citocinas con algunos parámetros del test d2.

Entre las citocinas analizadas, observamos que los elevados niveles plasmáticos de las citocinas proinflamatorias IL-17A e IL-21 se correlacionan con una menor puntuación de los aciertos de dígitos inversos, que evalúa la memoria de trabajo. La mayoría de los componentes proinflamatorios se correlacionan positivamente con un mayor tiempo empleado en la realización de la prueba de coordinación bimanual, pero, especialmente, la visuo-motora. Estos hallazgos sugieren que el ambiente proinflamatorio está asociado con el deterioro de la atención y velocidad de procesamiento, atención selectiva-sostenida y concentración mental en estos pacientes, memoria de trabajo y alteraciones motoras.

En resumen, se puede afirmar que la inflamación desempeña un papel clave en el desarrollo de las alteraciones cognitivas y motoras en los pacientes con NAFLD. Al igual que los

## Discusión

pacientes cirróticos con EHM, la inflamación y la hiperamonemia actúan de forma sinérgica para causar trastornos neurológicos en el deterioro cognitivo de los pacientes con NAFLD.

En los últimos años, se ha prestado atención al papel del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el deterioro cognitivo y la encefalopatía hepática. El BDNF es una neurotrofina que desempeña un papel importante en la síntesis, diferenciación, mantenimiento y supervivencia de las neuronas tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico. Estudios anteriores han observado que, en los pacientes cirróticos con EHM, los niveles de BDNF están disminuidos y la presencia de EHM se correlacionaba con los niveles de BDNF en sangre. Esto sugiere que la reducción en los niveles de BDNF podría contribuir al desarrollo de la EHM y que podría ser un posible biomarcador de la enfermedad (Stawicka et al, 2021). Además, un estudio con ratas hiperamonémicas demostró que los niveles de BDNF estaban reducidos mediante un mecanismo que puede implicar la producción de astrocitos, ya que se observó el mismo efecto en cultivos de astrocitos expuestos al amonio (Galland et al, 2017). Sin embargo, los niveles plasmáticos de BDNF son significativamente más altos en los pacientes con DCL en comparación con los pacientes sin DCL. Estos hallazgos concuerdan con datos previos en humanos que muestran un aumento de los niveles séricos de BDNF en estadios preclínicos y clínicos de la enfermedad de Alzheimer y un aumento significativo de la concentración de BDNF en regiones cerebrales como el hipocampo y la corteza parietal en cerebros de personas con dicha enfermedad. Los autores sugieren que este aumento de BDNF reflejaría un mecanismo compensatorio de reparación en las etapas tempranas y tardías de la neurodegeneración, así como un factor neuroprotector al contribuir a la degradación del beta-amiloide, una proteína asociada con la formación de placas seniles en la enfermedad de Alzheimer (Laskeet al, 2010; Angelucci et al, 2006; Durany et al, 2000).

Además, se ha observado un aumento de los niveles de CCL20 en pacientes con DCL con respecto a los pacientes sin DCL y al grupo control. La CCL20 es una citocina que puede contribuir a la infiltración de linfocitos T en el SNC, como se ha sugerido en estudios anteriores (Liao et al., 1999). En un estudio anterior de nuestro grupo observamos que los niveles de CCL20 estaban aumentados en pacientes con EHM, sugiriendo su posible papel en la infiltración linfocitaria (Mangas-Losada et al, 2017).

Nuestros resultados sugieren que la inflamación contribuye en mayor medida que la hiperamonemia a los trastornos neurológicos. Esto se deduce de la ausencia de cambios en los niveles sanguíneos de amonio en pacientes con NAFLD, frente a la detección de un aumento significativo en los niveles de citocinas plasmáticas en los pacientes con NAFLD que tenían DCL.

### **3 Alteraciones en el inmunofenotipo e inflamación periférica en los pacientes con NAFLD y DCL**

El sistema inmunológico juega un papel crucial en el desarrollo y progresión de la NAFLD, y su actividad varía a lo largo de las diferentes etapas de la enfermedad. En las primeras etapas de la NAFLD, la activación y reclutamiento de células del sistema inmunológico en el hígado pueden desencadenar una respuesta inflamatoria que contribuye a la lesión y muerte celular, favoreciendo así la progresión de la enfermedad, especialmente hacia la esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

Además, la combinación de acumulación de lípidos tóxicos (lipotoxicidad) e inflamación desencadena una respuesta inmune por parte de las células hepáticas, que busca controlar y reparar el daño sufrido.

Es importante destacar que esta inflamación puede extenderse más allá de los tejidos adiposos y hepáticos, afectando a otros órganos, como el cerebro. Aunque se ha planteado la posibilidad de que la inflamación sistémica desempeñe un papel relevante en el desarrollo del deterioro cognitivo en la NAFLD, aún no se comprende completamente cómo se propaga la inflamación hacia el cerebro (Miller y Spencer, 2014; Viscogliosi et al., 2013). A este respecto, es importante mencionar un estudio anterior de nuestro grupo en el cerebelo de pacientes con diferentes grados de enfermedad hepática, desde la esteatohepatitis leve hasta la cirrosis y encefalopatía hepática. Los resultados reportados demostraron que la infiltración de las células inmunes y consiguiente neuroinflamación ocurría también en el cerebelo de pacientes con esteatohepatitis leve. (Balzano et al, 2018).

## Discusión

En el trabajo de esta Tesis hemos demostrado que la aparición de DCL en pacientes con NAFLD se asocia a cambios específicos en el sistema inmunitario y en inflamación, que difieren de los encontrados en pacientes sin DCL y no dependen de las alteraciones inmunes subyacentes a la progresión de la enfermedad hepática.

En lo que respecta a la inmunidad innata, que constituye la primera línea de defensa, se observó que los pacientes con NAFLD presentaban una proporción más alta de monocitos con un fenotipo proinflamatorio conocidos como monocitos intermedios. Estos monocitos son precursores de los macrófagos M1, que son células proinflamatorias y producen diversas citocinas proinflamatorias, como IL-6, IL-23, IL-18, IL-1 $\beta$  y CCL20, lo que contribuye a la creación de un ambiente proinflamatorio.

Además, los pacientes con NAFLD mostraron niveles elevados de la proteína CCL2, también conocida como MCP-1, en comparación con el grupo de control. Aunque los pacientes con DCL tenían niveles más altos de CCL2 en comparación con los pacientes con NAFLD sin DCL, no se observaron diferencias significativas. También se analizó la expresión del ARN mensajero de su receptor, CCR2. Se encontró que los pacientes con DCL tenían una mayor expresión de CCR2 en comparación con los pacientes sin DCL y el grupo de control. CCL2 se expresa en monocitos y linfocitos T, y es la quimiocina más potente en la regulación de la migración e infiltración de monocitos y macrófagos (Sozzani et al, 1994). El receptor CCR2 desempeña un papel importante en ciertas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple, donde media la migración anormal de células al cerebro (Reale et al, 2019; Fantuzzi et al, 2008).

En la enfermedad de Alzheimer, CCL2 se expresa principalmente en microglía y macrófagos, que están implicados en la eliminación de la proteína  $\beta$ -amiloide, degradación de la mielina y pérdida neuronal (Britschgi et al, 2007). Se ha observado que los pacientes con deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer temprana presentan niveles elevados de CCL2 en el suero y líquido cefalorraquídeo, lo que posiblemente representa un evento temprano en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, mucho antes del inicio clínico de la enfermedad (Galimberti et al, 2006).

En modelos de inflamación hepática, se ha descubierto que las células de la microglía se activan y producen CCL2, lo que promueve la infiltración de monocitos en el sistema nervioso central (SNC) (D'Mello et al, 2009).

Los niveles elevados de CCL2 y su receptor CCR2 en pacientes con NAFLD y deterioro cognitivo leve podrían facilitar la infiltración de monocitos en el SNC y causar neuroinflamación.

Los monocitos y macrófagos desempeñan un papel importante como células presentadoras de antígenos junto con los linfocitos, lo que contribuiría a una mayor activación de los linfocitos como se observa en pacientes con DCL en NAFLD.

En lo que respecta a la respuesta inmune adaptativa, las células responsables son los linfocitos B (respuesta humoral) y los linfocitos T (respuesta celular), de los cuales se distinguen los linfocitos T citotóxicos (Tc), CD8<sup>+</sup>, y los linfocitos T efectoros o *helper* (Th), CD4<sup>+</sup>.

Como ya hemos mencionado, los linfocitos B, además de generar anticuerpos, participan activamente en la regulación de la respuesta inmune local a través de distintas funciones, como la presentación de antígenos a las células T (Molnarfi et al., 2013) y la secreción de citocinas pro- y anti-inflamatorias que pueden, a su vez, modular la diferenciación de los subtipos de células T CD4<sup>+</sup> (Li et al, 2015; Shen y Fillatreau, 2015). Los resultados descritos en este estudio indican que los pacientes con DCL, en el contexto de NAFLD, no presentan diferencias significativas con respecto a los otros grupos de estudio en el recuento total de linfocitos B, en cambio observamos una disminución significativa en la proporción de subpoblaciones activadas de células B inmaduras y transicionales y una disminución de los niveles de IgG plasmáticos, en comparación con los pacientes sin DCL.

Igualmente, en un estudio reciente se observó una disminución de las células B y de sus subpoblaciones de células inmaduras y transicionales, asociada a una disminución de las células Thf, en los pacientes con Parkinson (Li et al, 2021).

Es bien sabido que las células T *helper* interactúan con otros tipos de células inmunitarias, como las células mieloides y las células B, para modular sus funciones. Por lo tanto, es

## Discusión

razonable especular que las anormalidades que se han observado en los linfocitos B en pacientes con NAFLD y DCL, podrían estar relacionadas con alteraciones en las proporciones de células T, incluyendo el aumento de células Th17 que también se ha observado en estos pacientes.

Es interesante observar que en los pacientes con NAFLD los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> están alterados a la misma manera tanto en los pacientes con DCL como en los pacientes sin DCL. Esto sugiere que los linfocitos CD8<sup>+</sup> citotóxicos no parecen estar directamente implicados en la aparición del deterioro cognitivo leve. Sin embargo, se observa un aumento significativo en la proporción de los linfocitos CD8<sup>+</sup> de memoria, y los linfocitos CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> y CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> en pacientes con DCL en comparación al grupo control. Los linfocitos CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, en lugar de una función citotóxica, tienen función reguladora y supresora tanto directa, a través del contacto célula-célula (Colovai et al, 2000), como mediante la secreción de citocinas anti-inflamatorias, como la IL-10, TGF-β y IFN-γ (Balashov et al, 1995).

En los pacientes con NAFLD y deterioro cognitivo leve, se observó un incremento en el marcador de activación CD69 en todas las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. CD69 es un marcador de activación temprana en los linfocitos T, que aparece rápidamente en la superficie de las células activadas después de la interacción del receptor de células T (TCR) con el antígeno peptídico (Vilanova et al, 1999). Varios estudios han informado de la expresión de CD69 en los linfocitos infiltrados en sitios inflamatorios en diversas enfermedades inflamatorias crónicas en humanos (Afeltra et al, 1993; Crispin et al, 1998; Cibrián y Sánchez-Madrid, 2017).

CD69 también regula diversas funciones específicas de los subconjuntos de células T, como la diferenciación de las células T reguladoras (Treg) y la secreción de citocinas como IFN-γ, IL-17 e IL-22 (Cibrián y Sánchez-Madrid, 2017). Todas las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresaban niveles significativamente más elevados del marcador de activación temprana CD69 en el grupo de pacientes con DCL con respecto a los otros grupos de estudio. En particular observamos una mayor activación en los linfocitos T autorreactivos, CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> presentan un perfil altamente proinflamatorio y citotóxico, producen citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , también presentan en los depósitos intracelulares moléculas citotóxicas como la granzima B y la perforina que pueden lisar directamente las células endoteliales y dañar los tejidos (Mou et al, 2014; Betjes et al, 2011). Además, expresan CD161, una molécula que facilita la migración transendotelial y la invasión tisular (Warrington et al, 2001).

Sin embargo, la mayor expresión de CD69 en los linfocitos T en los pacientes con DCL indica una respuesta inmunitaria alterada y un posible papel de las vías de señalización en la patogénesis del deterioro cognitivo en esta NAFLD.

### **3.1 Alteraciones en la diferenciación de los distintos subtipos de linfocitos CD4<sup>+</sup> asociadas a la aparición del DCL**

En pacientes con NAFLD que presentan DCL, se ha observado una asociación con niveles elevados de varias citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el plasma, así como con una diferenciación anormal de los subconjuntos de linfocitos T efectores CD4<sup>+</sup>.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> desempeñan un papel crucial en el sistema inmunológico adaptativo y en la regulación de la respuesta inmunitaria y la inflamación. Su función depende de la señalización antigénica recibida y de las citocinas producidas por las células presentadoras de antígenos (APC), así como de la intensidad de la activación del receptor de células T (TCR).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* pueden diferenciarse en diferentes subconjuntos específicos, como las células T *helper* efectoras (Th) y las células T reguladoras (Tregs), que presentan funciones y respuestas inmunológicas especializadas. Estos subconjuntos se caracterizan por la expresión de factores de transcripción específicos, marcadores de superficie celular y la producción de citocinas clave.

Las células T efectoras (Th) pueden ser de subtipos como Th1, Th2, Th17, Th22 o Thf, dependiendo de las señales antigénicas y de las citocinas presentes en el entorno. Por otro

## Discusión

lado, las células T reguladoras (Tregs) son responsables de mantener un equilibrio inmunológico adecuado.

Para caracterizar las subpoblaciones de células Th y Tregs en pacientes con y sin deterioro cognitivo leve (DCL), se analizaron factores de transcripción clave, citocinas producidas por las células T CD4<sup>+</sup> aisladas y el patrón de citocinas en el plasma. En la Figura 46 se representan las citocinas más importantes responsables de la diferenciación de cada subtipo celular, los factores de transcripción característicos y las citocinas secretadas por cada uno de ellos.

En el contexto del deterioro cognitivo en NAFLD, se ha observado una mayor proporción de células Th17. Los linfocitos Th17 son activados por un conjunto de varias citocinas pro-inflamatorias, entre las cuales IL-6, IL-21 e IL-23 son esenciales para el desarrollo de Th17, mientras que la IL-17 es producida por las células Th17 (Ouyang et al, 2008). El papel clave de las células Th17 en el mecanismo patogénico de varios trastornos inflamatorios y enfermedades cerebrales, incluida la esclerosis múltiple, la lesión cerebral isquémica y la enfermedad de Alzheimer, está bien documentado (Kebir et al, 2007; Oberstein et al, 2018; Dolati et al, 2018; Cipollini et al, 2019 Shi et al, 2022).

Sin embargo, el efecto patogénico ejercido por las células Th17, y su característica citocina IL-17, sobre el SNC sigue siendo poco conocido. El hecho de que los pacientes con DCL presenten niveles plasmáticos mayores de las citocinas IL-6, IL-22, IL-23 y especialmente IL-17 en comparación con los pacientes sin DCL, podría indicar un aumento en la diferenciación de los linfocitos a Th17. Sin embargo, aunque observamos una menor expresión en PBMC del ARN mensajero del factor de transcripción RORC, marcador de las células Th17, las células T CD4<sup>+</sup> aisladas de pacientes con DCL liberan una mayor cantidad de IL-17 *in vitro*, incluso basalmente tanto en ausencia como en presencia de CD28 con respecto a los pacientes sin DCL y al grupo control. Además, las células Th17, presentaban mayor activación, medida por el del marcador CD69, en pacientes con DCL que los otros grupos de estudio. Un estudio reciente demostró los mecanismos de acción de las células Th17 y de IL-17 en el SNC (Kebir et al, 2007). El receptor de IL-17 (IL-17R) está presente en diferentes tipos de células en el SNC, y la IL-17 circulante causa la ruptura de la BHE

alterando las uniones estrechas y la expresión de la molécula de adhesión celular en las células endoteliales, favoreciendo la entrada de células Th17, neutrófilos y otras células inmunitarias periféricas en el SNC (Cipollini et al, 2019).

Este mecanismo podría explicar la infiltración de linfocitos T periféricos CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, Th17 y Thf en las meninges cerebelosas de pacientes con esteatohepatitis asociadas a la activación de microglía y astrocitos y pérdida de Purkinje y neuronas granulares (Balzano et al,2018). Un nivel plasmático alto de IL-17 indica la activación de Th17 en la circulación y podría causar la interrupción de la BHE y permitir la infiltración de células Th17 en el SNC, contribuyendo así a las alteraciones cognitivas y motoras observadas.

Los pacientes con NAFLD presentan una mayor activación de las células Th2, medida por el marcador CD69, con respecto al grupo control, pero sin diferencias significativas entre el grupo con y sin DCL. Por otro lado, en los pacientes con DCL observamos una menor expresión del factor de transcripción GATA3, marcador de los Th2, en comparación con los pacientes sin DCL. Sin embargo, observamos que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados de pacientes con DCL liberan mayores cantidades de IL-13 en comparación con los pacientes sin DCL. Como ya hemos comentado, los niveles plasmáticos de la citocina antiinflamatoria IL-13 estaban aumentados significativamente en los pacientes con DCL siendo predictivos del deterioro cognitivo en los pacientes con NAFLD. La IL-13 es una citocina asociada a la respuesta inmunológica de tipo Th2 y se ha relacionado con la regulación de la respuesta inmunitaria y la inflamación en diversos contextos patológicos. Estudios previos han establecido una asociación entre los niveles de IL-13 y la progresión de la NAFLD a esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Se ha observado que los pacientes con NASH tienen niveles más altos de IL-13 en comparación con los pacientes con NAFL, lo que sugiere que esta citocina podría desempeñar un papel en el proceso de progresión de la enfermedad hepática. Sin embargo, la IL-13 está implicada en la inducción de la fibrosis a través de la estimulación de la producción de TGFβ, el cual está involucrado en la promoción de la fibrosis hepática (Liu et al, 2012; Lee et al, 2001). Esta citocina por sus propiedades antiinflamatorias inhibe la producción de mediadores proinflamatorios como IL-1β y TNF-α. Además, se ha descrito que la IL-13 antagoniza los efectos del interferón gamma (IFN-γ), otra citocina proinflamatoria (Miossec y van den Berg, 1997; Kolosowska et al,2019).

## Discusión

Un estudio de Newcomb et al. ha demostrado por primera vez que las células Th17 humanas expresan IL-13R $\alpha$ 1 y que la IL-13 es importante en la regulación negativa de la producción de citocinas Th17 (Newcomb et al, 2011).

En estudios previos, se ha demostrado que la IL-13 puede modular la activación de las células microgliales y macrófagos, llevándolos hacia un fenotipo protector similar al de la polarización M2 en trastornos neurodegenerativos (Hamzei Taj et al, 2018; Gordon , 2003). Su elevada producción en pacientes con DCL podría representar un mecanismo de respuesta reguladora y compensatoria para contrarrestar la inflamación y el daño neuronal asociados con el deterioro cognitivo en la NAFLD, contribuyendo a la protección neuronal.

En cuanto a las células Th1 de los pacientes con DCL, estas presentaban un porcentaje celular inferior en comparación a los controles, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio en el porcentaje de células Th1 activadas. Además, la expresión en PBMC del factor de transcripción, marcador de estas células, TBX21, estaba disminuido en los pacientes con DCL respecto a los pacientes sin DCL que presentaban una expresión más alta también con respecto al grupo control. Las células Th1 son conocidas por ser fuentes principales de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y IL-12 en la respuesta inmune y la inflamación. Las concentraciones plasmáticas de IFN- $\gamma$  de los pacientes con DCL era más alta que los pacientes con NAFLD sin DCL y el grupo control. Por otra parte, los niveles de TNF- $\alpha$  y IL-12 eran similares en todos los grupos de estudio. Sin embargo, en las células TCD4<sup>+</sup> aisladas de pacientes con DCL la liberación de TNF- $\alpha$  *in vitro*, en presencia de CD28, estaba significativamente aumentada en comparación con los pacientes sin DCL y con los sujetos sanos.

La implicación de las células Th22 en la patogénesis y en las alteraciones neurológicas de enfermedades autoinmunes y EHM ha sido demostrada en estudios previos (Azizi et al., 2015; Mangas-Losada et al,2017). La IL-22 desempeña un papel importante en la formación de TLOs en las enfermedades autoinmunes. Esta citocina promueve la expresión de CXCL13, que es crucial para reclutar células B y células Thf y para la formación de TLOs. Estos procesos contribuyen a la activación de células B y a la infiltración de células inmunes en enfermedades autoinmunes (Barone et al., 2015).

En pacientes cirróticos con EHM, el aumento de las células Th22 puede contribuir a la formación de órganos linfoides terciarios (TLOs), la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos, y por tanto facilitar la infiltración de células inmunes en el cerebro que podrían ser unas de las causas del deterioro cognitivo en los pacientes con EHM (Mangas et al, 2017).

Además, estudios recientes han demostrado una asociación entre el factor de transcripción AHR, marcador de las células Th22, y el envejecimiento del cerebro humano, así como en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple (Ramos-García et al, 1983).

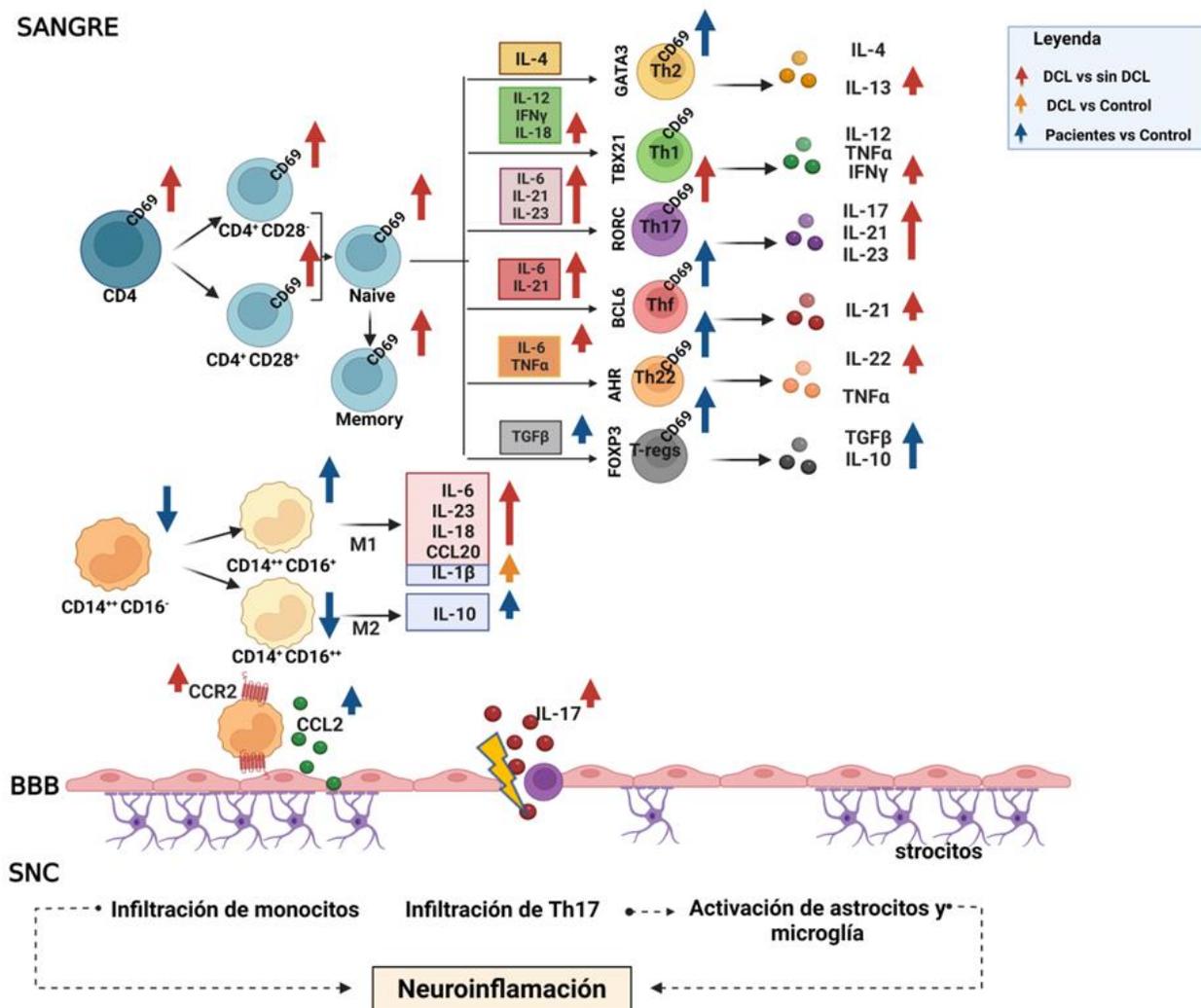
Asimismo, las células Th22 podrían estar implicadas en el desarrollo del deterioro cognitivo en pacientes con NAFLD. Aunque no hemos detectado que los linfocitos B presenten cambios relacionados con el DCL, los pacientes con DCL presentan una mayor activación en células Th22 con respecto al grupo control. Este estado de activación contribuiría al incremento en plasma de IL-22 que detectamos en los pacientes con DCL. Además, las células T CD4<sup>+</sup> de estos pacientes, en presencia de anti-CD28, liberan mayores cantidades de IL-22 *in vitro* con respecto a los otros grupos de estudio. El aumento de activación de Th22 se correlaciona además con un mayor número de errores en test d2, y los pacientes que presentan mayores niveles de IL22 en plasma presentan peor velocidad de procesamiento, como indica la correlación positiva con los errores cometidos en el test oral claves.

En cuanto a las células Thf, los pacientes con DCL presentaban un porcentaje más elevado y mayor activación que el grupo control. En consecuencia, los niveles plasmáticos de la citocina IL-21 que liberan dichas células están significativamente aumentados en los pacientes con DCL con respecto al grupo sin DCL y a los sujetos sanos. Como comentamos en el caso de las células Th22 en los pacientes con EHM, las células Thf también participan en la formación de los órganos linfoides terciarios (TLOs), y pueden contribuir a las alteraciones neurológicas en los pacientes con EHM a través de la infiltración de células inmunes (Mangas-Losada et al, 2017). De hecho, el aumento de estas células en sangre se correlaciona con un mayor deterioro cognitivo, medido por la nueva puntuación

## Discusión

desarrollada, y su activación es mayor en pacientes con la coordinación visuo-motora alterada.

Por último, en cuanto a las células Tregs, en los pacientes con DCL se observa una proporción mayor de células Tregs activadas con CD69 en comparación con el grupo control. Sin embargo, en la expresión del ARN mensajero del factor de transcripción FOXP3, que es un marcador clave de las células Tregs no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos de estudio. Además, los niveles plasmáticos del factor TFG- $\beta$  estaban aumentados en ambos grupos de pacientes con y sin DCL en comparación con el grupo control y en las células TCD4<sup>+</sup> aisladas de pacientes con DCL aumenta la liberación de TFG- $\beta$  *in vitro*, en condición de activación con anti-CD28. Estos datos sugieren que, aunque la proporción de células Tregs parece no estar alterada en pacientes con DCL, sí que lo está su estado de activación, indicado por la expresión de CD69. El aumento de los niveles plasmáticos de TFG- $\beta$  podría ser una respuesta compensatoria para contrarrestar la inflamación y el daño neuronal asociados. Diferentes estudios han demostrado el papel regulador de la TFG- $\beta$  en el sistema inmunológico y su papel neuroprotector en las enfermedades neurodegenerativas (Dobolyi et al, 2012).



**Figura 47. Esquema que resume los cambios en el inmunofenotipo y en la inflamación asociados al DCL en pacientes con NAFLD.** Las principales alteraciones asociadas al DCL son: (1) aumento de la activación de los linfocitos T CD69; (2) mayor activación de las células Th17 y aumento de los niveles plasmáticos de IL-17, lo que podría causar una alteración de la barrera hematoencefálica (BHE) favoreciendo la infiltración en el SNC de células inmunitarias periféricas, incluidas las células Th17. En el SNC (3) aumento de la IL-13, como respuesta antiinflamatoria respuesta antiinflamatoria compensatoria al aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias; (4) aumento de CCL2 y CCR2, que pueden promover la infiltración de monocitos en el SNC. Flechas hacia arriba: aumento; flechas hacia abajo: disminución

## Discusión

Los resultados de este estudio resaltan unos cambios específicos en el sistema inmunológico de los pacientes con NAFLD y deterioro cognitivo leve, y sugieren posibles mecanismos implicados en el desarrollo de este deterioro, como muestra la Figura 47.

Las principales alteraciones asociadas con el DCL incluyen: 1) una mayor activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, como se indica por el aumento de la expresión de CD69; 2) una mayor activación de las células Th17 y niveles plasmáticos elevados de IL-17, lo que puede provocar una ruptura de la BHE y permitir la entrada de células inmunitarias periféricas, incluyendo las células Th17, en el SNC. En el SNC, IL-17 tiene un efecto directo sobre las neuronas y oligodendrocitos causando daño, y activa los astrocitos y las microglías, lo que promueve la neuroinflamación; 3) un aumento de IL-13 que puede ser una respuesta antiinflamatoria compensatoria a la mayor expresión de citocinas proinflamatorias; 4) niveles elevados de CCL2 y CCR2 que pueden promover la infiltración de monocitos en el SNC (Figura 47).

En resumen, este estudio presenta información relevante sobre los mecanismos inmunológicos y las alteraciones neurológicas asociadas al deterioro cognitivo en pacientes con NAFLD. Sin embargo, la investigación en este campo aún está en curso y se requiere más evidencias científicas para comprender los mecanismos subyacentes. El entendimiento de estos cambios inmunológicos en los pacientes con DCL y NAFLD es importante para facilitar el diagnóstico temprano del deterioro cognitivo y desarrollar enfoques terapéuticos dirigidos a modular la respuesta inflamatoria y a revertir las alteraciones neurológicas asociadas.

## **VII. Conclusiones**



- 1.** Hemos desarrollado una nueva puntuación para detectar el deterioro cognitivo leve en pacientes con NAFLD, utilizando pruebas psicométricas específicas y sensibles en la evaluación de funciones cognitivas y motoras.
- 2.** El 30% de los pacientes con NAFLD presentan deterioro cognitivo leve, con alteraciones en la atención, concentración, memoria de trabajo y coordinación motora.
- 3.** La inflamación desempeña un papel crucial en la aparición y progresión del deterioro cognitivo leve en NAFLD y sus alteraciones neurológicas asociadas.
- 4.** El grado de daño hepático de los pacientes con NAFLD no determinan la aparición del deterioro cognitivo leve ni los cambios en el inmunofenotipo asociados a esta condición.
- 5.** Los pacientes con NAFLD presentan un aumento en el número de monocitos proinflamatorios en sangre y un ambiente proinflamatorio en plasma que condicionan la activación y el tipo de diferenciación de los linfocitos.
- 6.** El aumento de los niveles plasmáticos de CCL2 y de la expresión de su receptor CCR2 en los pacientes con deterioro cognitivo leve podrían promover la infiltración de monocitos en el SNC y desencadenar la neuroinflamación.
- 7.** Los pacientes con deterioro cognitivo leve presentan un aumento en el estado de activación de varios subtipos de linfocitos T, como indican el aumento del marcador CD69 y de citocinas proinflamatorias plasmáticas.
- 8.** Los pacientes con deterioro cognitivo leve presentan un incremento en la activación de las células Th17 y un aumento de los niveles plasmáticos de IL-17, lo que podría causar la ruptura de la barrera hematoencefálica, favoreciendo la entrada en el SNC de las células inmunes periféricas, incluidas las células Th17, induciendo la neuroinflamación.
- 9.** La mayor concentración de la citocina antiinflamatoria IL-13 en pacientes con deterioro cognitivo leve, puede ser una respuesta reguladora y compensatoria para contrarrestar la inflamación y el daño neuronal asociados con el deterioro cognitivo en la NAFLD.

**10.** Los pacientes con deterioro cognitivo leve, presentan una serie de cambios específicos en su inmunofenotipo e inflamación periférica que se asocian con la aparición de las alteraciones neurológicas en NAFLD.

## **VIII. Bibliografía**



Adams, R. D., & Foley, J. M. (1953). The neurological disorder associated with liver disease. *Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease*, 32, 198–237.

Afeltra, A., Galeazzi, M., Ferri, G. M., Amoroso, A., De Pità, O., Porzio, F., & Bonomo, L. (1993). Expression of CD69 antigen on synovial fluid T cells in patients with rheumatoid arthritis and other chronic synovitis. *Annals of the rheumatic diseases*, 52(6), 457–460. <https://doi.org/10.1136/ard.52.6.457>

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>

Angelucci, F., Spalletta, G., di Iulio, F., Ciaramella, A., Salani, F., Colantoni, L., Varsi, A. E., Gianni, W., Sancesario, G., Caltagirone, C., & Bossù, P. (2010). Alzheimer's disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) patients are characterized by increased BDNF serum levels. *Current Alzheimer research*, 7(1), 15–20. <https://doi.org/10.2174/156720510790274473>

Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A. M., & Feldstein, A. E. (2016). Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Digestive diseases and sciences*, 61(5), 1294–1303. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4049-x>

Atti, A. R., Valente, S., Iodice, A., Caramella, I., Ferrari, B., Albert, U., Mandelli, L., & De Ronchi, D. (2019). Metabolic Syndrome, Mild Cognitive Impairment, and Dementia: A Meta-Analysis of Longitudinal Studies. *The American journal of geriatric psychiatry: official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 27(6), 625–637. <https://doi.org/10.1016/j.jagp.2019.01.214>

## Bibliografía

Bajaj J. S. (2014). The role of microbiota in hepatic encephalopathy. *Gut microbes*, 5(3), 397–403. <https://doi.org/10.4161/gmic.28684>

Bajaj J. S. (2015). Microbiome and complications of liver disease. *Clinical liver disease*, 5(4), 96–99. <https://doi.org/10.1002/cld.460>

Bajaj, J. S., Saeian, K., Schubert, C. M., Hafeezullah, M., Franco, J., Varma, R. R., Gibson, D. P., Hoffmann, R. G., Stravitz, R. T., Heuman, D. M., Sterling, R. K., Shiffman, M., Topaz, A., Boyett, S., Bell, D., & Sanyal, A. J. (2009). Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(4), 1175–1183. <https://doi.org/10.1002/hep.23128>

Balashov, K. E., Khoury, S. J., Hafler, D. A., & Weiner, H. L. (1995). Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 95(6), 2711–2719. <https://doi.org/10.1172/JCI117973>

Balzano, T., Dadsetan, S., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., Casanova, B., Castro-Quintas, A., Ponce-Mora, A., Arenas, Y. M., Leone, P., Erceg, S., Llansola, M., & Felipo, V. (2020). Chronic hyperammonemia induces peripheral inflammation that leads to cognitive impairment in rats: Reversed by anti-TNF- $\alpha$  treatment. *Journal of hepatology*, 73(3), 582–592. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.008>

Balzano, T., Forteza, J., Borreda, I., Molina, P., Giner, J., Leone, P., Urios, A., Montoliu, C., & Felipo, V. (2018). Histological Features of Cerebellar Neuropathology in Patients With Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 77(9), 837–845. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly061>

Balzano, T., Forteza, J., Molina, P., Giner, J., Monzó, A., Sancho-Jiménez, J., Urios, A., Montoliu, C., & Felipo, V. (2018). The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Scientific reports*, 8(1), 3004. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21399-6>

Barone, F., Nayar, S., Campos, J., Cloake, T., Withers, D. R., Toellner, K. M., Zhang, Y., Fouser, L., Fisher, B., Bowman, S., Rangel-Moreno, J., Garcia-Hernandez, M.deL., Randall, T. D., Lucchesi, D., Bombardieri, M., Pitzalis, C., Luther, S. A., & Buckley, C. D. (2015). IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), 11024–11029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503315112>

Barrow, F., Khan, S., Wang, H., & Revelo, X. S. (2021). The Emerging Role of B Cells in the Pathogenesis of NAFLD. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 74(4), 2277–2286. <https://doi.org/10.1002/hep.31889>

Bates, M. E., & Lemay, E. P., Jr (2004). The d2 Test of attention: construct validity and extensions in scoring techniques. *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS*, 10(3), 392–400. <https://doi.org/10.1017/S135561770410307X>

Bedke, T., Muscate, F., Soukou, S., Gagliani, N., & Huber, S. (2019). Title: IL-10-producing T cells and their dual functions. *Seminars in immunology*, 44, 101335. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101335>

Bernsmeier, C., & Albano, E. (2017). Liver dendritic cells and NAFLD evolution: A remaining open issue. *Journal of hepatology*, 66(6), 1120–1122. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.02.018>

Betjes, M. G., Langerak, A. W., van der Spek, A., de Wit, E. A., & Litjens, N. H. (2011). Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney international*, 80(2), 208–217. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.110>

Bhattacharjee, J., Kirby, M., Softic, S., Miles, L., Salazar-Gonzalez, R. M., Shivakumar, P., & Kohli, R. (2017). Hepatic Natural Killer T-cell and CD8+ T-cell Signatures in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology communications*, 1(4), 299–310. <https://doi.org/10.1002/hep4.1041> Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder?. *Hepatology*. 2011;53(4):1372-1376. [doi:10.1002/hep.24228](https://doi.org/10.1002/hep.24228)

## Bibliografía

Boscá L, González-Ramos S, Prieto P, et al. Metabolic signatures linked to macrophage polarization: from glucose metabolism to oxidative phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* 2015;43(4):740-744. [doi:10.1042/BST20150107](https://doi.org/10.1042/BST20150107)

Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149-160. [doi:10.1002/path.2287](https://doi.org/10.1002/path.2287)

Brickenkamp, R., & Zillmer, E. (1998). *The d2 Test of Attention*. Seattle, WA: Hogrefe and Huber Publishers. <https://doi.org/10.1037/t03299-000>

Britschgi, M., & Wyss-Coray, T. (2007). Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *International review of neurobiology*, 82, 205–233. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)82011-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)82011-3)

Brown, G. T., & Kleiner, D. E. (2016). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.11.008>

Bruzzì, S., Sutti, S., Giudici, G., Burlone, M. E., Ramavath, N. N., Toscani, A., Bozzola, C., Schneider, P., Morello, E., Parola, M., Pirisi, M., & Albano, E. (2018). B2-Lymphocyte responses to oxidative stress-derived antigens contribute to the evolution of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Free radical biology & medicine*, 124, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.015>

Burchill, M. A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B. R., & Farrar, M. A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(1), 280–290. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.280>

Butterworth R. F. (2011). Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(4), 1372–1376. <https://doi.org/10.1002/hep.24228>

Butz, M., Timmermann, L., Braun, M., Groiss, S. J., Wojtecki, L., Ostrowski, S., Krause, H., Pollok, B., Gross, J., Südmeyer, M., Kircheis, G., Häussinger, D., & Schnitzler, A. (2010). Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy. *Acta neurologica Scandinavica*, 122(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2009.01246.x>

Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Montoliu, C., Malaguarnera, M., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., García-García, R., Mangas-Losada, A., Izquierdo-Altarejos, P., Arenas, Y. M., Leone, P., & Felipo, V. (2019). Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 226(2), e13270. <https://doi.org/10.1111/apha.13270>

Celikbilek, A., Celikbilek, M., & Bozkurt, G. (2018). Cognitive assessment of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 30(8), 944–950. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001131>

Chaplin D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>

Cheng, G., Huang, C., Deng, H., & Wang, H. (2012). Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Internal medicine journal*, 42(5), 484–491. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2012.02758.x>

Chung, C., Gottstein, J., & Blei, A. T. (2001). Indomethacin prevents the development of experimental ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 34(2), 249–254. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.26383>

Cibrián, D., & Sánchez-Madrid, F. (2017). CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *European journal of immunology*, 47(6), 946–953. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>

## Bibliografía

Cipollini, V., Anrather, J., Orzi, F., & Iadecola, C. (2019). Th17 and Cognitive Impairment: Possible Mechanisms of Action. *Frontiers in neuroanatomy*, 13, 95. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00095>

Colognesi, M., Gabbia, D., & De Martin, S. (2020). Depression and Cognitive Impairment-Extrahepatic Manifestations of NAFLD and NASH. *Biomedicines*, 8(7), 229. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8070229>

Crispin, J. C., Martínez, A., de Pablo, P., Velasquillo, C., & Alcocer-Varela, J. (1998). Participation of the CD69 antigen in the T-cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. *Scandinavian journal of immunology*, 48(2), 196–200. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1998.00366.x>

De Chiara, F., Heebøll, S., Marrone, G., Montoliu, C., Hamilton-Dutoit, S., Ferrandez, A., Andreola, F., Rombouts, K., Grønbaek, H., Felipo, V., Gracia-Sancho, J., Mookerjee, R. P., Vilstrup, H., Jalan, R., & Thomsen, K. L. (2018). Urea cycle dysregulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 69(4), 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.023>

de la Torre J. C. (2012). Cerebral hemodynamics and vascular risk factors: setting the stage for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 32(3), 553–567. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120793>

D'Mello, C., Le, T., & Swain, M. G. (2009). Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor $\alpha$  signaling during peripheral organ inflammation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(7), 2089–2102. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3567-08.2009>

Dobolyi, A., Vincze, C., Pál, G., & Lovas, G. (2012). The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8219–8258. <https://doi.org/10.3390/ijms13078219>

Dolati, S., Ahmadi, M., Khalili, M., Taheraghdam, A. A., Siahmansouri, H., Babaloo, Z., Aghebati-Maleki, L., Jadidi-Niaragh, F., Younesi, V., & Yousefi, M. (2018). Peripheral Th17/Tregs imbalance in elderly patients with ischemic stroke. *Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 39(4), 647–654. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3250-4>

Durany, N., Michel, T., Kurt, J., Cruz-Sánchez, F. F., Cervás-Navarro, J., & Riederer, P. (2000). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 18(8), 807–813.

Egeland J. (2015). 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. *Applied neuropsychology. Adult*, 22(6), 445–451. <https://doi.org/10.1080/23279095.2014.992069>

Elliott, C., Frith, J., Day, C. P., Jones, D. E., & Newton, J. L. (2013). Functional impairment in alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease is significant and persists over 3 years of follow-up. *Digestive diseases and sciences*, 58(8), 2383–2391. <https://doi.org/10.1007/s10620-013-2657-2>

Eriksen, P. L., Vilstrup, H., Rigbolt, K., Suppli, M. P., Sørensen, M., Heebøll, S., Veidal, S. S., Knop, F. K., & Thomsen, K. L. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease alters expression of genes governing hepatic nitrogen conversion. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 39(11), 2094–2101. <https://doi.org/10.1111/liv.14205>

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S. R., Schmidt-Weber, C. B., & Cavani, A. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of clinical investigation*, 119(12), 3573–3585. <https://doi.org/10.1172/JCI40202>

## Bibliografía

Fantuzzi, L., Tagliamonte, M., Gauzzi, M. C., & Lopalco, L. (2019). Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(24), 4869–4886. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03255-6>

Fargion, S., Porzio, M., & Fracanzani, A. L. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: state-of-the-art. *World journal of gastroenterology*, 20(37), 13306–13324. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i37.13306>

Felipo V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(12), 851–858. <https://doi.org/10.1038/nrn3587>

Felipo, V., & Butterworth, R. F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Progress in neurobiology*, 67(4), 259–279. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00019-9)

Felipo, V., Ordoño, J. F., Urios, A., El Mlili, N., Giménez-Garzó, C., Aguado, C., González-Lopez, O., Giner-Duran, R., Serra, M. A., Wassel, A., Rodrigo, J. M., Salazar, J., & Montoliu, C. (2012a). Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(2), 530–539. <https://doi.org/10.1002/hep.24704>

Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., Garcia-Torres, M. L., Civera, M., Olmo, J. A., Ortega, J., Martinez-Valls, J., Serra, M. A., Cassinello, N., Wassel, A., Jordá, E., & Montoliu, C. (2012b). Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 27(1), 51–58. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9269-3>

Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., & Blei, A. T. (2002). Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(3), 716–721. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31250>

Fricker, Z. P., Pedley, A., Massaro, J. M., Vasan, R. S., Hoffmann, U., Benjamin, E. J., & Long, M. T. (2019). Liver Fat Is Associated With Markers of Inflammation and Oxidative Stress in Analysis of Data From the Framingham Heart Study. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 17(6), 1157–1164.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.11.037>

Furue, K., Ito, T., Tsuji, G., Nakahara, T., & Furue, M. (2020). The CCL20 and CCR6 axis in psoriasis. *Scandinavian journal of immunology*, 91(3), e12846. <https://doi.org/10.1111/sji.12846>

Gabay C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis research & therapy*, 8 Suppl 2(Suppl 2), S3. <https://doi.org/10.1186/ar1917>

Galimberti, D., Fenoglio, C., Lovati, C., Venturelli, E., Guidi, I., Corrà, B., Scalabrini, D., Clerici, F., Mariani, C., Bresolin, N., & Scarpini, E. (2006). Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 27(12), 1763–1768. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.10.007>

Galland, F., Negri, E., Da Ré, C., Fróes, F., Strapazzon, L., Guerra, M. C., Tortorelli, L. S., Gonçalves, C. A., & Leite, M. C. (2017). Hyperammonemia compromises glutamate metabolism and reduces BDNF in the rat hippocampus. *Neurotoxicology*, 62, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.05.006>

Garden, G. A., & Möller, T. (2006). Microglia biology in health and disease. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 1(2), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9015-5>

Giles, D. A., Moreno-Fernandez, M. E., Stankiewicz, T. E., Cappelletti, M., Huppert, S. S., Iwakura, Y., Dong, C., Shanmukhappa, S. K., & Divanovic, S. (2016). Regulation of Inflammation by IL-17A and IL-17F Modulates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *PloS one*, 11(2), e0149783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149783>

## Bibliografía

Giménez-Garzó, C., Garcés, J. J., Urios, A., Mangas-Losada, A., García-García, R., González-López, O., Giner-Durán, R., Escudero-García, D., Serra, M. A., Soria, E., Felipo, V., & Montoliu, C. (2017). The PHES battery does not detect all cirrhotic patients with early neurological deficits, which are different in different patients. *PloS one*, 12(2), e0171211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171211>

Glaser, M. O., & Glaser, W. R. (1982). Time course analysis of the Stroop phenomenon. *Journal of experimental psychology. Human perception and performance*, 8(6), 875–894. <https://doi.org/10.1037//0096-1523.8.6.875>

Golden CJ. Stroop. In: *Color and Word Test. Manual.* (3rd ed.). Applied Psychology Publications. Barcelona: TEA Editions; 2001.

González-Amaro, R., Cortés, J. R., Sánchez-Madrid, F., & Martín, P. (2013). Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends in molecular medicine*, 19(10), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.07.006>

Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology*, 3(1), 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>

Grefhorst, A., van de Peppel, I. P., Larsen, L. E., Jonker, J. W., & Holleboom, A. G. (2021). The Role of Lipophagy in the Development and Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in endocrinology*, 11, 601627. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.601627>

Hamzei Taj, S., Le Blon, D., Hoornaert, C., Daans, J., Quarta, A., Praet, J., Van der Linden, A., Ponsaerts, P., & Hoehn, M. (2018). Targeted intracerebral delivery of the anti-inflammatory cytokine IL13 promotes alternative activation of both microglia and macrophages after stroke. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1212-7>

Herrero, M. J. (2010). ABC de los «Toll-like receptors»: relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes 11(4), 135–143. doi: [10.1016/j.semreu.2010.04.005](https://doi.org/10.1016/j.semreu.2010.04.005)

Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O., & Kenne, E. (2022). Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cellular & molecular immunology*, 19(2), 177–191. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00832-3>

Higarza, S. G., Arbolea, S., Gueimonde, M., Gómez-Lázaro, E., Arias, J. L., & Arias, N. (2019). Neurobehavioral dysfunction in non-alcoholic steatohepatitis is associated with hyperammonemia, gut dysbiosis, and metabolic and functional brain regional deficits. *PLoS one*, 14(9), e0223019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223019>

Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H. J., Waisman, A., & Kuhlmann, C. R. (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(4), 1023–1034. <https://doi.org/10.1096/fj.09-141978>

Ilan Y. (2012). Leaky gut and the liver: a role for bacterial translocation in nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology*, 18(21), 2609–2618. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i21.2609>

Imaizumi, T., Yoshida, H., & Satoh, K. (2004). Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 11(1), 15–21. <https://doi.org/10.5551/jat.11.15>

Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>

## Bibliografía

Jena, P. K., Sheng, L., Nguyen, M., Di Lucente, J., Hu, Y., Li, Y., Maezawa, I., Jin, L. W., & Wan, Y. Y. (2020). Dysregulated bile acid receptor-mediated signaling and IL-17A induction are implicated in diet-associated hepatic health and cognitive function. *Biomarker research*, 8(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00239-8>

Jiang, W., Desjardins, P., & Butterworth, R. F. (2009). Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. *Journal of neurochemistry*, 109(2), 485–493. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05981.x>

Jiang, W., Desjardins, P., & Butterworth, R. F. (2009). Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(5), 944–952. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.18>

Jover R, Rodrigo R, Felipe V, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis [published correction appears in *Hepatology*. 2006 Sep;44(3):771]. *Hepatology*. 2006;43(6):1257-1266. [doi:10.1002/hep.21180](https://doi.org/10.1002/hep.21180)

Juluri, R., Vuppalanchi, R., Olson, J., Unalp, A., Van Natta, M. L., Cummings, O. W., Tonascia, J., & Chalasani, N. (2011). Generalizability of the nonalcoholic steatohepatitis Clinical Research Network histologic scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of clinical gastroenterology*, 45(1), 55–58. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181dd1348>

Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W., & Hansbro, P. M. (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*, 123(3), 326–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x>

Karbalaei, R., Allahyari, M., Rezaei-Tavirani, M., Asadzadeh-Aghdaei, H., & Zali, M. R. (2018). Protein-protein interaction analysis of Alzheimer`s disease and NAFLD based on

systems biology methods unhide common ancestor pathways. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 11(1), 27–33.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., & Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine*, 13(10), 1173–1175. <https://doi.org/10.1038/nm1651>

Kim, D. G., Krenz, A., Toussaint, L. E., Maurer, K. J., Robinson, S. A., Yan, A., Torres, L., & Bynoe, M. S. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease induces signs of Alzheimer's disease (AD) in wild-type mice and accelerates pathological signs of AD in an AD model. *Journal of neuroinflammation*, 13, 1. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0467-5>

King C. (2009). New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nature reviews. Immunology*, 9(11), 757–766. <https://doi.org/10.1038/nri2644>

Kjærgaard, K., Mikkelsen, A. C. D., Wernberg, C. W., Grønkjær, L. L., Eriksen, P. L., Damholdt, M. F., Mookerjee, R. P., Vilstrup, H., Lauridsen, M. M., & Thomsen, K. L. (2021). Cognitive Dysfunction in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Current Knowledge, Mechanisms and Perspectives. *Journal of clinical medicine*, 10(4), 673. <https://doi.org/10.3390/jcm10040673>

Kleiner, D. E., & Makhlouf, H. R. (2016). Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clinics in liver disease*, 20(2), 293–312. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.10.011>

Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y. C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., Sanyal, A. J., & Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(6), 1313–1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>

## Bibliografia

Kolosowska, N., Keuters, M. H., Wojciechowski, S., Keksa-Goldsteine, V., Laine, M., Malm, T., Goldsteins, G., Koistinaho, J., & Dhungana, H. (2019). Peripheral Administration of IL-13 Induces Anti-inflammatory Microglial/Macrophage Responses and Provides Neuroprotection in Ischemic Stroke. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 16(4), 1304–1319. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00761-0>

Kühn, R., Rajewsky, K., & Müller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5032), 707–710. <https://doi.org/10.1126/science.1948049>

Labenz, C., Kostev, K., Kaps, L., Galle, P. R., & Schattenberg, J. M. (2021). Incident Dementia in Elderly Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Germany. *Digestive diseases and sciences*, 66(9), 3179–3185. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06644-1>

Laske, C., Stransky, E., Leyhe, T., Eschweiler, G. W., Wittorf, A., Richartz, E., Bartels, M., Buchkremer, G., & Schott, K. (2006). Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 113(9), 1217–1224. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0397-y>

LeCluyse, E. L., Witek, R. P., Andersen, M. E., & Powers, M. J. (2012). Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Critical reviews in toxicology*, 42(6), 501–548. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.682115>

Lee, C. G., Homer, R. J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliansky, V., Shipley, J. M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., Senior, R. M., & Elias, J. A. (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta (1). *The Journal of experimental medicine*, 194(6), 809–821. <https://doi.org/10.1084/jem.194.6.809>

Lee, G. H., & Lee, W. W. (2016). Unusual CD4+CD28- T Cells and Their Pathogenic Role in Chronic Inflammatory Disorders. *Immune network*, 16(6), 322–329. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.6.322>

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070–11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>

Li, R., Rezk, A., Healy, L. M., Muirhead, G., Prat, A., Gommerman, J. L., Bar-Or, A., & MSSRF Canadian B cells in MS Team (2016). Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology*, 6, 626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00626>

Li, R., Tropea, T. F., Baratta, L. R., Zuroff, L., Diaz-Ortiz, M. E., Zhang, B., Shinoda, K., Rezk, A., Alcalay, R. N., Chen-Plotkin, A., & Bar-Or, A. (2021). Abnormal B-Cell and Tfh-Cell Profiles in Patients With Parkinson Disease: A Cross-sectional Study. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, 9(2), e1125. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001125>

Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine*, 203(10), 2271–2279. <https://doi.org/10.1084/jem.20061308>

Liao, F., Rabin, R. L., Smith, C. S., Sharma, G., Nutman, T. B., & Farber, J. M. (1999). CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 162(1), 186–194.

Liu, Y., Munker, S., Müllenbach, R., & Weng, H. L. (2012). IL-13 Signaling in Liver Fibrogenesis. *Frontiers in immunology*, 3, 116. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00116>

Lukacs-Kornek, V., & Schuppan, D. (2013). Dendritic cells in liver injury and fibrosis: shortcomings and promises. *Journal of hepatology*, 59(5), 1124–1126. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.05.033>

## Bibliografía

Lykke Eriksen, P., Sørensen, M., Grønþæk, H., Hamilton-Dutoit, S., Vilstrup, H., & Thomsen, K. L. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease causes dissociated changes in metabolic liver functions. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 43(5), 551–560. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.01.001>

Ma, C. S., Tangye, S. G., & Deenick, E. K. (2010). Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21. *Immunology and cell biology*, 88(6), 621–623. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.73>

Machado, M. V., & Diehl, A. M. (2016). Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 150(8), 1769–1777. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.066>

Maldonado-Garza, H. J., Vázquez-Elizondo, G., Gaytán-Torres, J. O., Flores-Rendón, A. R., Cárdenas-Sandoval, M. G., & Bosques-Padilla, F. J. (2011). Prevalence of minimal hepatic encephalopathy in cirrhotic patients. *Annals of hepatology*, 10 Suppl 2, S40–S44.

Mangas-Losada, A., García-García, R., Leone, P., Ballester, M. P., Cabrera-Pastor, A., Urios, A., Gallego, J. J., Martínez-Pretel, J. J., Giménez-Garzó, C., Revert, F., Escudero-García, D., Tosca, J., Ríos, M. P., Montón, C., Durbán, L., Aparicio, L., Montoliu, C., & Felipo, V. (2019). Selective improvement by rifaximin of changes in the immunophenotype in patients who improve minimal hepatic encephalopathy. *Journal of translational medicine*, 17(1), 293. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2046-5>

Mangas-Losada, A., García-García, R., Urios, A., Escudero-García, D., Tosca, J., Giner-Durán, R., Serra, M. A., Montoliu, C., & Felipo, V. (2017). Minimal hepatic encephalopathy is associated with expansion and activation of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, Th22 and Tfh and B lymphocytes. *Scientific reports*, 7(1), 6683. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05938-1>

Marques, R. E., Guabiraba, R., Russo, R. C., & Teixeira, M. M. (2013). Targeting CCL5 in inflammation. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(12), 1439–1460. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.837886>

Martín, P., Gómez, M., Lamana, A., Cruz-Adalia, A., Ramírez-Huesca, M., Ursa, M. A., Yáñez-Mo, M., & Sánchez-Madrid, F. (2010). CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. *Molecular and cellular biology*, 30(20), 4877–4889. <https://doi.org/10.1128/MCB.00456-10>

Marzio, R., Mauël, J., & Betz-Corradin, S. (1999). CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 21(3), 565–582. <https://doi.org/10.3109/08923979909007126>

Maurice, J., & Manousou, P. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical medicine (London, England)*, 18(3), 245–250. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-245>

Mehal W. Z. (2013). The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 10(11), 637–644. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.146>

Mendiola, A. S., & Cardona, A. E. (2018). The IL-1 $\beta$  phenomena in neuroinflammatory diseases. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 125(5), 781–795. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1732-9>

Miller, A. A., & Spencer, S. J. (2014). Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain, behavior, and immunity*, 42, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.04.001>

Miossec, P., & van den Berg, W. (1997). Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 40(12), 2105–2115. <https://doi.org/10.1002/art.1780401203>

Miossec, P., Korn, T., & Kuchroo, V. K. (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England journal of medicine*, 361(9), 888–898. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0707449>

## Bibliografía

Miyake, T., Abe, M., Tokumoto, Y., Hirooka, M., Furukawa, S., Kumagi, T., Hamada, M., Kawasaki, K., Tada, F., Ueda, T., Hiasa, Y., Matsuura, B., & Onji, M. (2013). B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology international*, 7(2), 539–547. <https://doi.org/10.1007/s12072-012-9345-8>

Mohammed, S. K., Magdy, Y. M., El-Waseef, D. A., Nabih, E. S., Hamouda, M. A., & El-Kharashi, O. A. (2020). Modulation of hippocampal TLR4/BDNF signal pathway using probiotics is a step closer towards treating cognitive impairment in NASH model. *Physiology & behavior*, 214, 112762. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112762>

Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M. S., Patarroyo, J. C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., Shetty, A., Linington, C., Slavin, A. J., Hidalgo, J., Jenne, D. E., Wekerle, H., Sobel, R. A., Bernard, C. C., Shlomchik, M. J., & Zamvil, S. S. (2013). MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *The Journal of experimental medicine*, 210(13), 2921–2937. <https://doi.org/10.1084/jem.20130699>

Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M. A., del Olmo, J. A., Urios, A., Rodrigo, J. M., & Felipo, V. (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *Journal of clinical gastroenterology*, 43(3), 272–279. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31815e7f58>

Moreno, C., Gustot, T., Nicaise, C., Quertinmont, E., Nagy, N., Parmentier, M., Le Moine, O., Devière, J., & Louis, H. (2005). CCR5 deficiency exacerbates T-cell-mediated hepatitis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 42(4), 854–862. <https://doi.org/10.1002/hep.20865>

Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(5), a021873. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>

Mou, D., Espinosa, J., Lo, D. J., & Kirk, A. D. (2014). CD28 negative T cells: is their loss our gain? *American journal of transplantation: official journal of the American Society of*

Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 14(11), 2460–2466. <https://doi.org/10.1111/ajt.12937>

Nakamura, Y., Abe, M., Kawasaki, K., Miyake, T., Watanabe, T., Yoshida, O., Hirooka, M., Matsuura, B., & Hiasa, Y. (2019). Depletion of B cell-activating factor attenuates hepatic fat accumulation in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *Scientific reports*, 9(1), 977. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37403-y>

Newcomb, D. C., Boswell, M. G., Zhou, W., Huckabee, M. M., Goleniewska, K., Sevin, C. M., Hershey, G. K., Kolls, J. K., & Peebles, R. S., Jr (2011). Human TH17 cells express a functional IL-13 receptor and IL-13 attenuates IL-17A production. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127(4), 1006–13.e134. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.043>

Newsome, P. N., Sasso, M., Deeks, J. J., Paredes, A., Boursier, J., Chan, W. K., Yilmaz, Y., Czernichow, S., Zheng, M. H., Wong, V. W., Allison, M., Tsochatzis, E., Anstee, Q. M., Sheridan, D. A., Eddowes, P. J., Guha, I. N., Cobbold, J. F., Paradis, V., Bedossa, P., Miette, V., ... Harrison, S. A. (2020). FibroScan-AST (FAST) score for the non-invasive identification of patients with non-alcoholic steatohepatitis with significant activity and fibrosis: a prospective derivation and global validation study. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 5(4), 362–373. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30383-8](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30383-8)

Ng, T. P., Feng, L., Nyunt, M. S., Feng, L., Gao, Q., Lim, M. L., Collinson, S. L., Chong, M. S., Lim, W. S., Lee, T. S., Yap, P., & Yap, K. B. (2016). Metabolic Syndrome and the Risk of Mild Cognitive Impairment and Progression to Dementia: Follow-up of the

Singapore Longitudinal Ageing Study Cohort. *JAMA neurology*, 73(4), 456–463. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.4899>

Oberstein, T. J., Taha, L., Spitzer, P., Hellstern, J., Herrmann, M., Kornhuber, J., & Maler, J. M. (2018). Imbalance of Circulating T<sub>H</sub>17 and Regulatory T Cells in Alzheimer's Disease: A Case Control Study. *Frontiers in immunology*, 9, 1213. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01213>

## Bibliografía

Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I., & Oliven, A. (2004). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 24(2), 110–116. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2004.0894.x>

Odena G, Bataller R. Fibrogenesis hepática: fisiopatología [Liver fibrogenesis: physiopathology]. *Gastroenterol Hepatol*. 2012;35 Suppl 2:3-9. [doi:10.1016/S0210-5705\(12\)70043-2](https://doi.org/10.1016/S0210-5705(12)70043-2)

Ouyang, W., Kolls, J. K., & Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 28(4), 454–467. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004>

Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet (London, England)*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)

Paul, W. E., & Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews. Immunology*, 10(4), 225–235. <https://doi.org/10.1038/nri2735>

Pedditz, E., Peters, R., & Beckett, N. (2016). The risk of overweight/obesity in mid-life and late life for the development of dementia: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Age and ageing*, 45(1), 14–21. <https://doi.org/10.1093/ageing/afv151>

Peña-Casanova, J., Quiñones-Ubeda, S., Quintana-Aparicio, M., Aguilar, M., Badenes, D., Molinuevo, J. L., Torner, L., Robles, A., Barquero, M. S., Villanueva, C., Antúnez, C., Martínez-Parra, C., Frank-García, A., Sanz, A., Fernández, M., Alfonso, V., Sol, J. M., Blesa, R., & NEURONORMA Study Team (2009). Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): norms for verbal span, visuospatial span, letter and number sequencing, trail making test, and symbol digit modalities test. *Archives of clinical neuropsychology: the official journal of the National Academy of Neuropsychologists*, 24(4), 321–341. <https://doi.org/10.1093/arclin/acp038>

Pinçon, A., De Montgolfier, O., Akkoyunlu, N., Daneault, C., Pouliot, P., Villeneuve, L., Lesage, F., Levy, B. I., Thorin-Trescases, N., Thorin, É., & Ruiz, M. (2019). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, and the Underlying Altered Fatty Acid Metabolism, Reveals Brain Hypoperfusion and Contributes to the Cognitive Decline in APP/PS1 Mice. *Metabolites*, 9(5), 104. <https://doi.org/10.3390/metabo9050104>

Rama Rao, K. V., Jayakumar, A. R., Tong, X., Alvarez, V. M., & Norenberg, M. D. (2010). Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes. *Journal of neuroinflammation*, 7, 66. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-66>

Raman, M., Ahmed, I., Gillevet, P. M., Probert, C. S., Ratcliffe, N. M., Smith, S., Greenwood, R., Sikaroodi, M., Lam, V., Crotty, P., Bailey, J., Myers, R. P., & Rioux, K. P. (2013). Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 11(7), 868–75.e753. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.02.015>

Ramos-García, N. A., Orozco-Ibarra, M., Estudillo, E., Elizondo, G., Gómez Apo, E., Chávez Macías, L. G., Sosa-Ortiz, A. L., & Torres-Ramos, M. A. (2020). Aryl Hydrocarbon Receptor in Post-Mortem Hippocampus and in Serum from Young, Elder, and Alzheimer's Patients. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1983. <https://doi.org/10.3390/ijms21061983>

Reale, M., Iarlori, C., Feliciani, C., & Gambi, D. (2008). Peripheral chemokine receptors, their ligands, cytokines and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 14(2), 147–159. <https://doi.org/10.3233/jad-2008-14203>

Rojkind, M., & Ponce-Noyola, P. (1982). The extracellular matrix of the liver. Collagen and related research, 2(2), 151–175. [https://doi.org/10.1016/s0174-173x\(82\)80031-9](https://doi.org/10.1016/s0174-173x(82)80031-9)

Rolla, S., Alchera, E., Imarisio, C., Bardina, V., Valente, G., Cappello, P., Mombello, C., Follenzi, A., Novelli, F., & Carini, R. (2016). The balance between IL-17 and IL-22 produced by liver-infiltrating T-helper cells critically controls NASH development in

## Bibliografía

mice. *Clinical science* (London, England: 1979), 130(3), 193–203.  
<https://doi.org/10.1042/CS20150405>

Romero-Gómez M. (2005). Role of phosphate-activated glutaminase in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 20(4), 319–325.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-005-7913-5>

Romero-Gómez, M., Córdoba, J., Jover, R., del Olmo, J. A., Ramírez, M., Rey, R., de Madaria, E., Montoliu, C., Nuñez, D., Flavia, M., Compañy, L., Rodrigo, J. M., & Felipo, V. (2007). Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 45(4), 879–885.  
<https://doi.org/10.1002/hep.21586>

Rose, C. F., Amodio, P., Bajaj, J. S., Dhiman, R. K., Montagnese, S., Taylor-Robinson, S. D., Vilstrup, H., & Jalan, R. (2020). Hepatic encephalopathy: Novel insights into classification, pathophysiology and therapy. *Journal of hepatology*, 73(6), 1526–1547.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.013>

Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*, 10(7), 490–500.  
<https://doi.org/10.1038/nri2785>

Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology*, 22, 745–763. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>

Salmond, R. J., Filby, A., Qureshi, I., Caserta, S., & Zamoyska, R. (2009). T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunological reviews*, 228(1), 9–22.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00745.x>

Sanford A. M. (2017). Mild Cognitive Impairment. *Clinics in geriatric medicine*, 33(3), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2017.02.005>

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>

Schroeder, H. W., Jr, & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>

Seo, S. W., Gottesman, R. F., Clark, J. M., Hernaez, R., Chang, Y., Kim, C., Ha, K. H., Guallar, E., & Lazo, M. (2016). Nonalcoholic fatty liver disease is associated with cognitive function in adults. *Neurology*, 86(12), 1136–1142. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002498>

Serfaty, L., & Lemoine, M. (2008). Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes & metabolism*, 34(6 Pt 2), 634–637. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(08\)74597-X](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(08)74597-X)

Shaikh, P. Zuber. “Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review.” (2011).

Sharma, P., Sharma, B. C., & Sarin, S. K. (2010). Critical flicker frequency for diagnosis and assessment of recovery from minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*, 9(1), 27–32.

Shawcross, D. L., Davies, N. A., Williams, R., & Jalan, R. (2004). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *Journal of hepatology*, 40(2), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.10.016>

## Bibliografia

Shawcross, D. L., Sharifi, Y., Canavan, J. B., Yeoman, A. D., Abeles, R. D., Taylor, N. J., Auzinger, G., Bernal, W., & Wendon, J. A. (2011). Infection and systemic inflammation, not ammonia, are associated with Grade 3/4 hepatic encephalopathy, but not mortality in cirrhosis. *Journal of hepatology*, 54(4), 640–649. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.045>

Shen, P., & Fillatreau, S. (2015). Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nature reviews. Immunology*, 15(7), 441–451. <https://doi.org/10.1038/nri3857>

Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 11(11), 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>

Shi, Y., Wei, B., Li, L., Wang, B., & Sun, M. (2022). Th17 cells and inflammation in neurological disorders: Possible mechanisms of action. *Frontiers in immunology*, 13, 932152. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.932152>

Sinn, D. H., Kang, D., Chang, Y., Ryu, S., Gu, S., Kim, H., Seong, D., Cho, S. J., Yi, B. K., Park, H. D., Paik, S. W., Song, Y. B., Lazo, M., Lima, J. A., Guallar, E., Cho, J., & Gwak, G. Y. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease and progression of coronary artery calcium score: a retrospective cohort study. *Gut*, 66(2), 323–329. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311854>

Smith, A. (1968) The Symbol-Digit Modalities Test: A Neuropsychologic Test of Learning and Other Cerebral Disorders. In: *Learning Disorders*, Special Child Publications, Seattle, 83-91.

Solfrizzi, V., Scafato, E., Custodero, C., Loparco, F., Ciavarella, A., Panza, F., Seripa, D., Imbimbo, B. P., Lozupone, M., Napoli, N., Piazzolla, G., Galluzzo, L., Gandin, C., Baldereschi, M., Di Carlo, A., Inzitari, D., Pilotto, A., Sabbà, C., & Italian Longitudinal Study on Aging Working Group (2020). Liver fibrosis score, physical frailty, and the risk of dementia in older adults: The Italian Longitudinal Study on Aging. *Alzheimer's & dementia* (New York, N. Y.), 6(1), e12065. <https://doi.org/10.1002/trc2.12065>

Sozzani, S., Zhou, D., Locati, M., Rieppi, M., Proost, P., Magazin, M., Vita, N., van Damme, J., & Mantovani, A. (1994). Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 152(7), 3615–3622.

Stawicka, A., Świdarska, M., Zbrzeźniak, J., Sołowianowicz, N., Woszczenko, A., Flisiak, R., & Jaroszewicz, J. (2021). Brain-derived neurotrophic factor as a potential diagnostic marker in minimal hepatic encephalopathy. *Clinical and experimental hepatology*, 7(1), 117–124. <https://doi.org/10.5114/ceh.2021.103242>

Steen-Louws, C., Hartgring, S. A. Y., Popov-Celeketic, J., Lopes, A. P., de Smet, M. B. M., Eijkelkamp, N., Lafeber, F. P. J. G., Hack, C. E., & van Roon, J. A. G. (2019). IL4-10 fusion protein: a novel immunoregulatory drug combining activities of interleukin 4 and interleukin 10. *Clinical and experimental immunology*, 195(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/cei.13224>

Stockinger, B., & Omenetti, S. (2017). The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nature reviews. Immunology*, 17(9), 535–544. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.50>

Sutti, S., & Albano, E. (2020). Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 17(2), 81–92. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0210-2>

Takahashi, A., Kono, S., Wada, A., Oshima, S., Abe, K., Imaizumi, H., Fujita, M., Hayashi, M., Okai, K., Miura, I., Yabe, H., & Ohira, H. (2017). Reduced brain activity in female patients with non-alcoholic fatty liver disease as measured by near-infrared spectroscopy. *PloS one*, 12(4), e0174169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174169>

Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>

## Bibliografía

Targher, G., Byrne, C. D., Lonardo, A., Zoppini, G., & Barbui, C. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *Journal of hepatology*, 65(3), 589–600. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.013>

Thapa, M., Chinnadurai, R., Velazquez, V. M., Tedesco, D., Elrod, E., Han, J. H., Sharma, P., Ibegbu, C., Gewirtz, A., Anania, F., Pulendran, B., Suthar, M. S., & Grakoui, A. (2015). Liver fibrosis occurs through dysregulation of MyD88-dependent innate B-cell activity. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 61(6), 2067–2079. <https://doi.org/10.1002/hep.27761>

Thomsen, K. L., Grønæk, H., Glavind, E., Hebbard, L., Jessen, N., Clouston, A., George, J., & Vilstrup, H. (2014). Experimental nonalcoholic steatohepatitis compromises ureagenesis, an essential hepatic metabolic function. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 307(3), G295–G301. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00036.2014>

Tomar, N., & De, R. K. (2014). A brief outline of the immune system. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1184, 3–12. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_1)

Torre, P., Motta, B. M., Sciorio, R., Masarone, M., & Persico, M. (2021). Inflammation and Fibrogenesis in MAFLD: Role of the Hepatic Immune System. *Frontiers in medicine*, 8, 781567. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.781567>

Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current biology: CB*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

Tripodi, A., Fracanzani, A. L., Primignani, M., Chantarangkul, V., Clerici, M., Mannucci, P. M., Peyvandi, F., Bertelli, C., Valenti, L., & Fargion, S. (2014). Procoagulant imbalance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 61(1), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.03.013>

Tulunay, A., Yavuz, S., Direskeneli, H., & Eksioğlu-Demiralp, E. (2008). CD8+CD28-, suppressive T cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 17(7), 630–637. <https://doi.org/10.1177/0961203308089400>

Tuttolomondo, A., Petta, S., Casuccio, A., Maida, C., Corte, V. D., Daidone, M., Di Raimondo, D., Pecoraro, R., Fonte, R., Cirrincione, A., Zafonte, R., Cabibi, D., Cammà, C., Di Marco, V., Licata, A., Magliozzo, F., Marchesini, G., Merlino, G., Craxì, A., & Pinto, A. (2018). Reactive hyperemia index (RHI) and cognitive performance indexes are associated with histologic markers of liver disease in subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a case control study. *Cardiovascular diabetology*, 17(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0670-7>

Veniaminova, E., Oplatchikova, M., Bettendorff, L., Kotenkova, E., Lysko, A., Vasilevskaya, E., Kalueff, A. V., Fedulova, L., Umriukhin, A., Lesch, K. P., Anthony, D. C., & Strekalova, T. (2020). Prefrontal cortex inflammation and liver pathologies accompany cognitive and motor deficits following Western diet consumption in non-obese female mice. *Life sciences*, 241, 117163. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117163>

Vignali, D. A., & Kuchroo, V. K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology*, 13(8), 722–728. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>

Vilanova, M., Tavares, D., Ferreira, P., Oliveira, L., Nóbrega, A., Appelberg, R., & Arala-Chaves, M. (1996). Role of monocytes in the up-regulation of the early activation marker CD69 on B and T murine lymphocytes induced by microbial mitogens. *Scandinavian journal of immunology*, 43(2), 155–163. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1996.d01-25.x>

Vilstrup, H., Amodio, P., Bajaj, J., Cordoba, J., Ferenci, P., Mullen, K. D., Weissenborn, K., & Wong, P. (2014). 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 (Baltimore, Md.)*, 60(2), 715–735. <https://doi.org/10.1002/hep.27210>

## Bibliografia

Viscogliosi, G., Andreozzi, P., Chiriac, I. M., Cipriani, E., Servello, A., Marigliano, B., Ettorre, E., & Marigliano, V. (2013). Depressive symptoms in older people with metabolic syndrome: is there a relationship with inflammation? *International journal of geriatric psychiatry*, 28(3), 242–247. <https://doi.org/10.1002/gps.3817>

Wang, X., Lupardus, P., Laporte, S. L., & Garcia, K. C. (2009). Structural biology of shared cytokine receptors. *Annual review of immunology*, 27, 29–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090616>

Warrington, K. J., Takemura, S., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2001). CD4+, CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis and rheumatism*, 44(1), 13–20. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200101\)44:1<13::AID-ANR3>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200101)44:1<13::AID-ANR3>3.0.CO;2-6)

Wechsler, D. (1955) *Manual for the Wechsler adult intelligence scale*. Psychological Corporation, New York.

Weinstein, G., Davis-Plourde, K., Himali, J. J., Zelber-Sagi, S., Beiser, A. S., & Seshadri, S. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease, liver fibrosis score and cognitive function in middle-aged adults: The Framingham Study. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 39(9), 1713–1721. <https://doi.org/10.1111/liv.14161>

Weinstein, G., Zelber-Sagi, S., Preis, S. R., Beiser, A. S., DeCarli, C., Speliotes, E. K., Satizabal, C. L., Vasan, R. S., & Seshadri, S. (2018). Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease With Lower Brain Volume in Healthy Middle-aged Adults in the Framingham Study. *JAMA neurology*, 75(1), 97–104. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3229>

Weissenborn, K., Ennen, J. C., Schomerus, H., Rückert, N., & Hecker, H. (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*, 34(5), 768–773. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00026-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00026-5)

Wolf, M. J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., Lorentzen, A., Einer, C., Schulz, S., Clavel, T., Protzer, U., Thiele, C., Zischka, H., Moch, H., Tschöp, M., Tumanov, A. V., ... Heikenwalder, M. (2014). Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer cell*, 26(4), 549–564. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>

Wolters, F. J., Zonneveld, H. I., Hofman, A., van der Lugt, A., Koudstaal, P. J., Vernooij, M. W., Ikram, M. A., & Heart-Brain Connection Collaborative Research Group (2017). Cerebral Perfusion and the Risk of Dementia: A Population-Based Study. *Circulation*, 136(8), 719–728. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027448>

Wright, G., Davies, N. A., Shawcross, D. L., Hodges, S. J., Zwingmann, C., Brooks, H. F., Mani, A. R., Harry, D., Stadlbauer, V., Zou, Z., Williams, R., Davies, C., Moore, K. P., & Jalan, R. (2007). Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(6), 1517–1526. <https://doi.org/10.1002/hep.21599>

Wright, G., Shawcross, D., Olde Damink, S. W., & Jalan, R. (2007). Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension. *Metabolic brain disease*, 22(3-4), 375–388. <https://doi.org/10.1007/s11011-007-9071-4>

Yasuda, K., Nakanishi, K., & Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 649. <https://doi.org/10.3390/ijms20030649>

Yela, M. & López Ladrón, L. Un test de coordinación visuo-motora. *Revista de Psicología General y Aplicada* 10, 409–421 (1995).

Yela, M. Un test de rapidez motora. *Revista de Psicología General y Aplicada* 10, 137–148 (1955).

## Bibliografía

Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., & Nakanishi, K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 161(7), 3400–3407.

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 64(1), 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>

Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., & Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(1), 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>

Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European journal of pharmacology*, 877, 173090. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>

Zhang, F., Jiang, W. W., Li, X., Qiu, X. Y., Wu, Z., Chi, Y. J., Cong, X., & Liu, Y. L. (2016). Role of intrahepatic B cells in non-alcoholic fatty liver disease by secreting pro-inflammatory cytokines and regulating intrahepatic T cells. *Journal of digestive diseases*, 17(7), 464–474. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12362>

Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology*, 28, 445–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>

Zhu, L., Baker, S. S., Gill, C., Liu, W., Alkhouri, R., Baker, R. D., & Gill, S. R. (2013). Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 57(2), 601–609. <https://doi.org/10.1002/hep.26093>Ziegler, S. F., Ramsdell, F., & Alderson, M. R.

## Bibliografía

(1994). The activation antigen CD69. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 12(5), 456–465.  
<https://doi.org/10.1002/stem.5530120502>



## **IX. Anexo**



**INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL CLINICO  
UNIVERSITARIO DE VALENCIA**

Doña Marina Soro Domingo, Presidenta del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínic Universitario de Valencia

## CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión ordinaria, de fecha 25 de Julio de 2019 (Acta nº 350), se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación:

**Nº DE ORDEN:** 2018/123

**TITULO:** Estudio de las alteraciones neurológicas, cerebrales y bioquímicas en pacientes con enfermedad grasa del hígado. Mecanismos moleculares y celulares.

**ENMIENDA:** Enmienda nº 1 de 3 de julio de 2019

**MOTIVO ENMIENDA:**

- Actualización del protocolo: Proyecto versión 1.1 del 3 de julio de 2019.
- Actualización Hoja de información a controles versión 1.1 del 3 de julio de 2019.
- Actualización Hoja de información a pacientes versión 1.1 del 3 de julio de 2019.

**PETICIÓN:** INTERNO

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho proyecto este centro.

Este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por la Dra. Carmina Montoliu en el Laboratorio de Deterioro Neurológico de INCLIVA, como investigadora principal, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación biomédica.

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 25 de julio de 2019



Fdo. : Doña Marina Soro Domingo