

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

**TITULACIÓN: MÁSTER EN INVESTIGACION EN
CIENCIAS DE LA SALUD: FARMACOLOGIA,
NEUROBIOLOGIA Y NUTRICION MOLECULAR**



TRABAJO FIN DE MASTER

**HUELLA MOLECULAR EN SANGRE PERIFERICA EN
PACIENTES CIRROTICOS TERMINALES**

AUTOR

M^a PILAR BUENO REQUENA

DIRECTOR

JESUS FRANCISCO BERMEJO MARTIN

VALLADOLID, SEPTIEMBRE DE 2014

INDICE

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	6
2.1 Etiología y clasificación.....	6
2.2 Manifestaciones clínicas.....	8
2.3 Hallazgos radiológicos.....	8
2.4 Diagnóstico.....	9
2.5 Cirrosis hepática y expresión génica.....	9
3. Hipótesis.....	11
4. Objetivos.....	11
5. Material y métodos.....	11
5.1 Extracción ARN total.....	12
5.2 Evaluación calidad y cantidad de ARN total.....	12
5.3 Amplificación y marcaje.....	13
5.4 Evaluación de la concentración, integridad y rendimiento del ARNc.....	13
5.5 Hibridación.....	13
5.6 Escaneado.....	14
5.7 Procesado de la imagen y extracción de datos.....	14
6. Diseño del estudio.....	14
6.1 Pacientes.....	14
6.2 Datos clínicos y de laboratorio.....	14
6.3 Análisis estadístico.....	15
6.4 Análisis bioinformático.....	15

6.5 Consentimiento informado.....	16
7. Resultados.....	16
7.1 Características clínicas de los pacientes.....	16
7.2 Expresión génica.....	18
8. Discusión.....	26
9. Conclusiones.....	28
10. Bibliografía.....	29

RESUMEN

La cirrosis representa un estadio terminal de fibrosis hepática progresiva caracterizado por una distorsión de la arquitectura hepática y la formación de nódulos regenerativos. Se caracteriza por una fase denominada cirrosis hepática compensada, donde el enfermo permanece asintomático y su descubrimiento se produce al detectar hepatomegalia o a través del hallazgo de anomalías en los niveles de enzimas hepáticas y una segunda fase (cirrosis descompensada) en la que, en cambio, aparece una clínica rápidamente progresiva marcada por el desarrollo de complicaciones, la más frecuente de éstas la ascitis (se presenta hasta en un 60% de los casos) además, su expectativa de vida es inferior respecto a la población normal.

La Cirrosis es una de las principales causas de morbi-mortalidad en los países desarrollados. Aproximadamente el 90% de las causas de cirrosis hepática en países occidentales son consecuencia del abuso de alcohol, la enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHNA) y la hepatitis crónica vírica. A escala mundial, la hepatitis crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) con más de 400 millones de enfermos infectados representa la etiología más importante. La causa de la cirrosis permanece desconocida en cerca del 10% de los casos (cirrosis criptogénica) y aproximadamente el 70% de estos casos se cree que en la actualidad están relacionados con la EHNA dentro del contexto de resistencia a la insulina y síndrome metabólico, mientras que el resto puede estar en relación con mecanismos autoinmunes. Varios factores etiológicos tales como hemocromatosis y alcohol, o alcohol y hepatitis C pueden acelerar la progresión a cirrosis.

Generalmente, una vez alcanzado el estadio de cirrosis, se considera que la enfermedad es irreversible y la única opción terapéutica posible pasa por el trasplante hepático. Sin embargo, existen casos documentados de cirrosis reversibles en estadios iniciales: se trata de cirrosis de etiología diversa que se han resuelto al ser tratada la causa que las originó. Por tanto, conocer la patogénesis de esta enfermedad puede ayudar a evitar su progresión y mejorar la supervivencia. A fin de profundizar en la fisiopatología de la cirrosis hepática, hemos diseñado un estudio prospectivo para analizar las diferencias entre la firma transcriptómica de un grupo de pacientes cirróticos y otro de voluntarios sanos.

INTRODUCCION

Etiología y clasificación

Son diversas las causas que conducen a la aparición de cirrosis, ya sea como consecuencia de una inflamación hepática crónica o debido a la colestasis. En los países desarrollados, las dos causas más frecuentes de cirrosis son el alcoholismo y el Virus de la Hepatitis C, representando ambas aproximadamente el 50% del total de pacientes en lista de espera de trasplante hepático durante el 2011 (1,2). En países desarrollados, las principales causas de cirrosis se resumen en la siguiente tabla:

Etiología de la cirrosis hepática

Metabólica-tóxica

Alcohol

Enfermedad de hígado graso no alcohólico (resistencia a la insulina, síndrome metabólico)

Cirrosis infantil de la India

Infecciosa

Virus de las hepatitis VHB, VHC y VHD

Eschistosomiasis

Autoinmune

Hepatitis autoinmune

Cirrosis biliar primaria

Colangitis autoinmune

Síndromes de solapamiento o superposición

Inducido por fármacos

Arsénico, metotrexato, isoniazida, amiodarona, α -metildopa, CCl_4

Genético-hereditaria

Hemocromatosis hereditaria

Enfermedad de Wilson

Déficit de α 1-antitripsina

Porfiria cutánea tarda

Enfermedades por depósito de glucógeno

Galactosemia

Tirosinemia

Abetalipoproteinemia

Fibrosis quística

Enfermedades biliares

Cirrosis biliar secundaria (obstrucción biliar por estenosis, litiasis de larga evolución...)

Colangitis esclerosante primaria

Colangitis asociada IgG4

Colangiopatía isquémica

Ductopenia

Atresia de vías biliares

Síndrome de Alagille

Vascular

Insuficiencia cardíaca crónica derecha ("cirrosis cardiaca")

Pericarditis constrictiva crónica

Síndrome de Budd-Chiari

Síndrome de obstrucción sinusoidal (enfermedad venooclusiva)

Telangiectasia hemorrágica hereditaria (enfermedad Rendu-Osler-Weber)

Criptogenética

Históricamente, la cirrosis se ha clasificado en base a criterios morfológicos en: micronodular, macronodular y mixta (3):

La *cirrosis micronodular* se caracteriza por la presencia de nódulos de un tamaño inferior a 3 mm de diámetro. Las causas que conducen a su aparición son fundamentalmente enfermedad alcohólica, hemocromatosis, colestasis y obstrucción al flujo venoso hepático.

En la *cirrosis macronodular* los nódulos tienen un tamaño superior a los 3 mm y suele ser secundaria a las hepatitis crónicas virales.

A pesar de que, tradicionalmente la clasificación morfológica ha sido la comúnmente empleada, ésta presenta una serie de limitaciones y por ello, se encuentra ya en desuso. En primer lugar, es relativamente inespecífica respecto a la etiología. En segundo lugar, hay que tener en cuenta que la apariencia del hígado puede cambiar conforme la enfermedad avanza: de hecho, la cirrosis micronodular suele evolucionar a cirrosis macronodular (4). Por otra parte, los marcadores serológicos actuales son más específicos que la morfología hepática a la hora de determinar la etiología de la cirrosis: un ejemplo de ello son los anticuerpos antimitocondriales, con una especificidad del 98% para la cirrosis biliar primaria (5). Finalmente, una evaluación exhaustiva de la morfología hepática solo puede realizarse por medio de cirugía, laparoscopia o autopsia.

Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la cirrosis incluyen síntomas inespecíficos (anorexia, pérdida de peso, debilidad, fatiga) y síntomas y signos de descompensación hepática (ictericia, prurito, signos de hemorragia gastrointestinal alta, distensión abdominal por ascitis, confusión por encefalopatía hepática, etc.) Como hallazgos en la exploración podemos encontrar además de la ictericia mencionada previamente: arañas vasculares, ginecomastia, ascitis, esplenomegalia, eritema palmar, etc. Respecto a alteraciones en las pruebas de laboratorio destaca la elevación en suero de los siguientes parámetros: bilirrubina, aminotransferasas, fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltanspeptidasa; tiempo de protrombina e INR. De igual modo son frecuentes la hiponatremia, hipoalbuminemia y trombocitopenia.

Hallazgos radiológicos

Estudios radiológicos como el ultrasonido abdominal, tomografía axial computerizada (TAC) y resonancia magnética sugieren la presencia de cirrosis: en éstos se observa un hígado retraído, irregular y nodular. El estudio de estas imágenes también puede mostrar la presencia de varices y ascitis en pacientes con hipertensión portal.

Diagnóstico

En pacientes con sospecha de cirrosis, se obtendrán imágenes de la cavidad abdominal a fin de analizar el parénquima hepático y detectar manifestaciones extrahepáticas de cirrosis. La biopsia hepática es la prueba definitiva para la confirmación del diagnóstico (bien en el contexto de una autopsia o tras un trasplante hepático) ya que de este modo se puede apreciar claramente la arquitectura del hígado al completo. En la práctica clínica, los procedimientos más usuales para realizar la biopsia hepática son: biopsia percutánea, biopsia transyugular y Punción-aspiración con aguja fina (PAAF) guiada con ecografía o Tomografía Axial Computerizada (TAC). La sensibilidad en el diagnóstico de cirrosis se encuentra en un rango del 80-100% dependiendo del método empleado, del tamaño y número de muestras obtenidas. Sin embargo, no es completamente necesaria si los datos clínicos, radiológicos y de laboratorio sugieren claramente la presencia de cirrosis y no supone una modificación del abordaje del paciente.

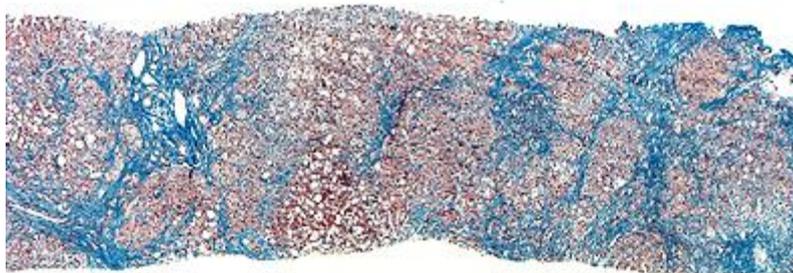


Figura 1: Biopsia hepática obtenida mediante aguja (40x) de una paciente de 61 años con obesidad, diabetes e hiperlipemia y que presentaba elevación de transaminasas en suero. La biopsia muestra una fibrosis parcheada (azul), infiltrados peri-portales inflamatorios y una marcada esteatosis. Estos hallazgos son compatibles con una cirrosis secundaria a esteatohepatitis no alcohólica.

Jeremy Ditelberg, MD

En muchas ocasiones, la biopsia hepática puede orientar hacia la causa: especialmente cuando ésta es metabólica (hemocromatosis, hepatitis colestásica no alcohólica, Enfermedad de Wilson y déficit de α -1-antitripsina, entre otras).

Cirrosis hepática y expresión génica

El estudio de los perfiles de expresión génica es una herramienta que permite el análisis de las diferencias a nivel de expresión entre diferentes tipos celulares o tejidos. En nuestro caso, se recurrirá a los *arrays* de expresión para analizar dichos perfiles.

Los *arrays* de expresión miden la señal de expresión a nivel genómico-transcriptómico y/o a nivel exónico de miles de genes simultáneamente de una muestra dada, gracias a la técnica de hibridación específica ARN-ADN o ADN-ADN. Se trata de *microarrays* de oligonucleótidos de alta densidad que incluyen miles de conjuntos de sondas (*probesets*) con secuencias del transcriptoma de la especie estudiada dispuestas sobre la base del *array*. Cada sonda es un oligonucleótido complementario a la región estudiada representado miles de veces en microceldas del *array*. La señal obtenida de la hibridación de la muestra (ARN o ADN marcado y fragmentado) con las sondas-oligo dispuestas en los *microarrays* proporciona la medida del nivel de expresión de la muestra analizada (6).

No obstante, la realización de arrays supone una aproximación inicial al perfil de expresión génica, puesto que éste ha de ser confirmado por medio de una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) a tiempo real: RT-PCR. De este modo, podrán relacionarse las diferencias a nivel de expresión génica con los diversos procesos patogénicos, estableciendo grupos de genes y rutas importantes en la patogénesis de la cirrosis hepática.

No es mucho lo que se conoce acerca de las rutas moleculares intrahepáticas en hígados normales y patológicos. La diversidad celular que presenta el hígado implica la existencia de interacciones celulares que desempeñan un papel importante en la fisiopatología del mismo: por ejemplo, el virus de la hepatitis C y el consumo de alcohol son dos causas principales de carcinoma hepatocelular y cirrosis relacionada con descompensación hepática. El virus provoca una inflamación del lóbulo hepático que evoluciona a fibrosis, y eventualmente, a cirrosis. Existe además, una respuesta inespecífica intrahepática mediada por células T CD8 y expresión de citoquinas implicadas en la respuesta Th1. La inflamación resultante se caracteriza por una respuesta fibrótica activa, proliferación celular y apoptosis. Sin embargo, las rutas moleculares concretas implicadas en la enfermedad hepática no están claramente definidas, aunque existen algunos estudios realizados con arrays que muestran la existencia de genes diferencialmente expresados relacionados con la respuesta Th1, inflamación, fibrosis, proliferación, señalización, apoptosis y estrés oxidativo (7).

El estudio de las diferencias a nivel de expresión génica entre pacientes cirróticos y personas sanas permite un mayor conocimiento de la patogenia de esta enfermedad: además, se podrán establecer nuevos biomarcadores que permitan conocer y evaluar el estado de los pacientes con enfermedad hepática. El tiempo es un parámetro fundamental en estos casos y por tanto, la utilización de biomarcadores que nos permitan monitorizar la progresión a cirrosis, supondría una mejora en la calidad asistencial a nivel hospitalario, reduciendo el número de trasplantes a realizar y los costes económicos que esta problemática genera.

HIPOTESIS

Existen perfiles de expresión génica característicos de la cirrosis cuya identificación puede ser útil para desarrollar herramientas moleculares de diagnóstico y pronóstico en esta enfermedad.

OBJETIVOS

El presente trabajo se realizó mediante un estudio prospectivo con los siguientes objetivos:

1. Estudiar los perfiles de expresión génica diferencial en pacientes con cirrosis avanzada respecto a controles sanos.
2. Identificar perfiles de expresión con potencial aplicación diagnóstica o pronóstica en la cirrosis.

MATERIAL Y METODOS

Se extrajo RNA de sangre periférica. El transcriptoma se analizó utilizando microarrays de transcriptoma humano completo de Agilent®. Éste análisis se llevó a cabo en los dos grupos de pacientes: cirróticos terminales y controles sanos.

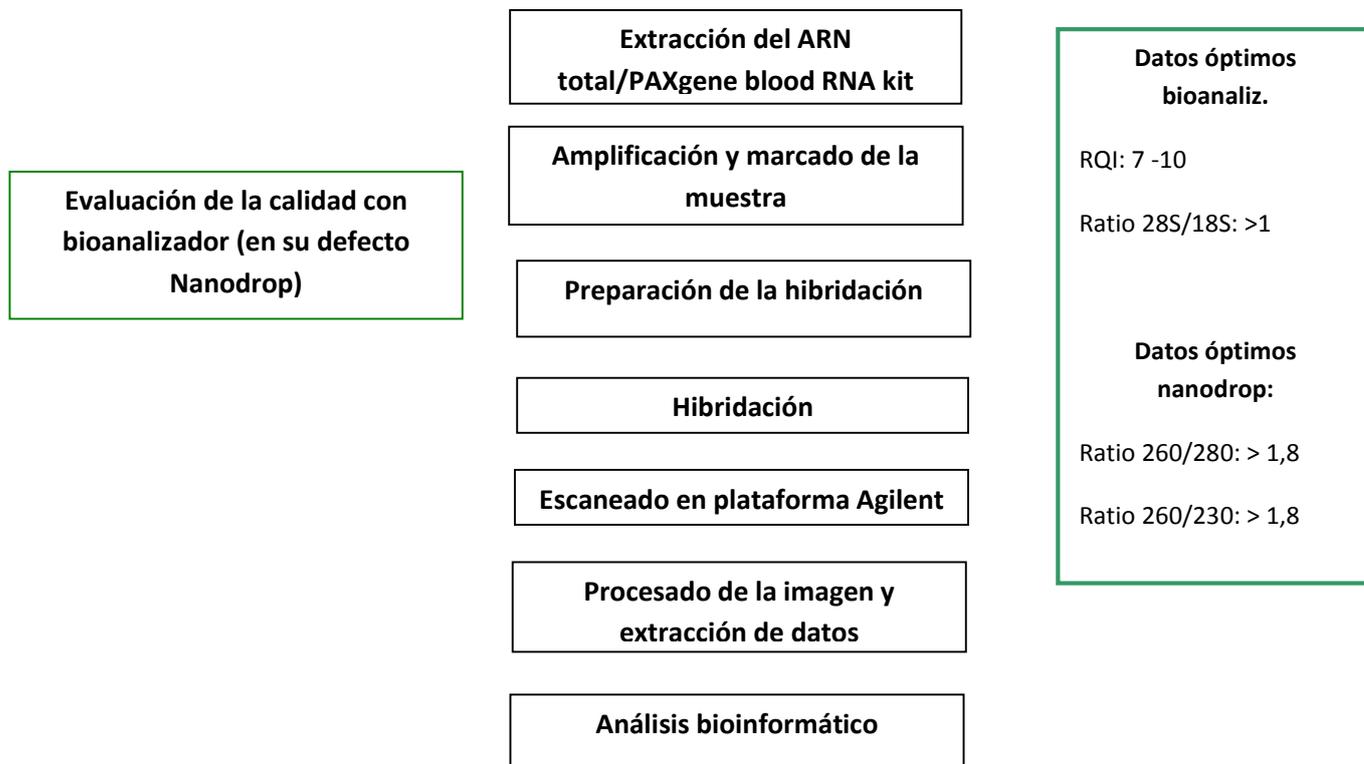


Figura 2: Esquema de trabajo para el análisis de expresión génica

Extracción del ARN total

La extracción del ARN total se realizó a partir de los tubos PAXgene empleando el equipo “PAXgene blood RNA kit”. El fundamento de este kit se basa en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales. Se trata de un proceso de purificación que permite la obtención de ARN altamente purificado y listo para usar en procesos posteriores.

Evaluación de la cantidad y calidad del ARN total

Para obtener resultados reproducibles y comparables en el análisis de expresión génica, es necesario utilizar una cantidad fija de ARN en todos los experimentos. Si se adapta una cantidad de ARN fijo y un tiempo de reacción de amplificado y marcaje concreto, se conseguirá la cantidad de ARNc necesaria para el experimento.

La cantidad de ARN de partida recomendada para obtener una cantidad óptima de ARNc (500 ng a 2 g) es de 50 a 500 ng, siendo la cantidad mínima 25 ng, y la máxima 11 µL.

Las reacciones de amplificación de ARN pueden variar considerablemente en función de la integridad y la pureza del ARN de partida. El ARN no debe estar degradado ni contaminado con proteínas o ADN. La pureza e integridad del ARN se estimó mediante una espectrofotometría y una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído.

Los perfiles de expresión génica se evaluaron, únicamente en aquellas muestras con una pureza e integridad adecuadas.

Amplificación y Marcaje

El primer paso es una retrotranscripción inversa para la síntesis de casi la totalidad de la longitud del ADN complementario (ADNc), mediante la tecnología ArrayScript, lo que asegura la obtención de muestras reproducibles para el análisis de microarrays.

El segundo paso se encarga de convertir la cadena simple de ADN complementario en una doble cadena de ADN (dsADN) ya lista para el proceso de transcripción. La reacción emplea una ADN polimerasa y una RNasa H que simultáneamente degrada el ARN y sintetiza la segunda cadena de ADNc. Posteriormente se realiza una purificación de ADNc para eliminar posibles restos de ARN, enzimas, y sales que pueden inhibir la transcripción.

Evaluación de la concentración, integridad y rendimiento del ARNc

Hay que tener en cuenta tanto la cantidad, calidad e integridad del ARN de partida como del ARNc generado antes de realizar la hibridación con los chips de expresión génica. Por ello debe realizarse una evaluación de la cantidad de ARNc obtenido y el rendimiento del marcaje mediante espectrofotometría. La concentración de una solución ARNc se puede determinar midiendo su absorbancia a 260 nm. En nuestro caso se utilizaron bioanalizador y espectrofotómetro NanoDrop 1000A.

Hibridación

El proceso de hibridación se realizó utilizando arrays de expresión génica de transcriptoma humano completo con la tecnología 4x44K v2 de Agilent. Solamente

se hibridaron los ARNs resultantes del proceso de transcripción in vitro y purificación con una calidad e integridad adecuadas.

Escaneado

El escaneado se realizó con la plataforma “Agilent”. Se trata de un sistema compacto de alto rendimiento de escáner para obtener imágenes de microarrays.

Procesado de la imagen y extracción de datos

Una vez obtenidos los archivos de imágenes, utilizando dicho software, se transformaron las intensidades de las señales obtenidas en datos numéricos.

Diseño del estudio

Se trata de un estudio prospectivo observacional donde se recogieron datos demográficos, clínicos y de laboratorio correspondientes a 37 pacientes cirróticos terminales sometidos a Trasplante Ortotópico de hígado (TOH) en la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Rio Hortega de Valladolid (HRH) durante el período 2012-2013.

Pacientes

Criterios de inclusión: se incluyeron todos aquellos pacientes que ingresaron en la Unidad de Trasplante Hepático del HRH y a los que finalmente se les realizó un TOH y que firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Criterios de exclusión: no firmar consentimiento informado y tener menos de 18 años.

Datos clínicos y de laboratorio

Los datos clínicos y analíticos de los pacientes fueron recogidos de las historias clínicas informatizadas a través del programa interno de historias clínicas y del Sistema Informático de laboratorio (SIL) del HRH respectivamente.

Los valores de los distintos parámetros analíticos se recogieron en el momento previo a la realización del trasplante hepático.

A la hora de establecer una clasificación pronóstica de supervivencia y asignación de prioridad en el trasplante se nos plantea la posibilidad de utilizar dos escalas: MELD y CHILD-PUGH: la primera se basa en el cálculo de una puntuación según los valores de bilirrubina, creatinina sérica e INR (Ratio Internacional

Normalizado). El resultado obtenido puede tomar valores de 6 a 40, correspondiendo una menor puntuación a un mejor pronóstico.

Por otra parte, Child Pugh emplea para su cálculo: bilirrubina total, albúmina, proteínas totales, grado de ascitis y de encefalopatía. Estos dos últimos parámetros pueden presentar cierto grado de subjetividad frente al resto de parámetros analíticos, por ello nos hemos decantado por la escala MELD, calculada en el momento previo al trasplante.

Análisis estadístico

Los datos demográficos y las características clínicas de los pacientes vienen recogidas en una tabla de descriptivos clínicos (Tabla 1). Las variables cuantitativas se representaron con la media y desviación estándar y las cualitativas con frecuencias (expresadas en porcentaje). Para los parámetros analíticos se indican, además, las unidades y rangos de referencia.

Se realizaron las siguientes comparaciones: Cirróticos terminales VS Controles Sanos (comparación general); VHC VS Controles Sanos; No VHC VS Controles Sanos; Hepatocarcinoma VS Controles Sanos y No Hepatocarcinoma VS Controles Sanos.

Análisis bioinformático

Se llevó a cabo una normalización (por el percentil 75) y transformación de los datos mediante la utilización del software bioinformático GeneSpring GX 11.0. Este software proporciona herramientas estadísticas muy potentes que permiten la visualización rápida y el análisis de microarrays.

Para seleccionar los genes cuya expresión cambiaba como consecuencia de un estado de cirrosis terminal se utilizaron distintas pruebas estadísticas. Se realizó un test de t de Student para identificar los genes cuyos niveles de expresión eran diferentes de forma estadísticamente significativa, fijando un p valor menor de 0,05 y un filtro que solo aceptaba aquellas diferencias con un ratio >2 o < -2 , entre los diferentes grupos.

Una vez que se obtuvo una lista de genes diferencialmente expresados entre ambos grupos, mediante el software bioinformático Ingenuity Pathways (IPA), se estudiaron las rutas canónicas y las funciones relacionadas con dichos genes, identificando aquellas rutas diferencialmente expresadas entre ambos grupos (p valor $< 0,05$).

Consentimiento informado

La aprobación tanto científica como ética del estudio se obtuvo del Comité Científico para Investigación Clínica del HRUH. Se mantuvo la identificación de los pacientes en el anonimato.

RESULTADOS

Características clínicas de los pacientes

La mayoría de nuestros pacientes eran hombres de edad media-avanzada. Las principales causas que condujeron al estadio de cirrosis terminal fueron el alcoholismo y el Virus de la Hepatitis C. Respecto a las comorbilidades más frecuentes, destacan la presencia de hepatocarcinoma, consumo de alcohol, hipertensión y diabetes mellitus tipo II. El score MELD medio fué de 11.68. Destaca, asimismo, la elevación de Proteína C Reactiva, uratos y enzimas hepáticas:

Características de los pacientes		Valores de Referencia
Edad (Media ± SD)	56,54±8,736	
Sexo, n(%)	26 (70)	
Causas (%):		
VHC	4(10,8)	
Alcoholismo	21(56,8)	
VHC+Alcoholismo	5(13,5)	
Otras causas:	7(18,9)	
Comorbilidades (%):		
Hepatocarcinoma	16(43,2)	
Historia de alcoholismo	26(70,3)	
Diabetes Mellitus II	9(24,3)	
HTA	14(37,8)	
MELD Score	11,68±4,04	
Recuento celular		
Hemoglobina (g/dl)	11,65±2,28	13,2-16,8
Leucocitos (x10 ³ /μl)	5216,22±3209,84	4-10,5
Neutrófilos (%)	64,91±14,42	41-72
Plaquetas (x10 ³ /μl)	91216,22±47842,99	150-350
Coagulación		
Tiempo de Protrombina (segundos)	78,41±19,58	60-140
INR	1,13±0,32	0,8-1,2
BIOQUÍMICA		
Glucosa (mg/dl)	133,03±70,84	82-115
Albúmina (g/dl)	3,38±0,81	3,5-4,6
Bilirrubina (mg/dl)	2,59±1,89	0,2-1,1
Colesterol (mg/dl)	153,35±41,51	<200
Triglicéridos (mg/dl)	94,24±40,38	<150
Proteína C Reactiva (mg/L)	28,47±76,67	0-10
Ácido Úrico (mg/dl)	6,57±2,62	2,6-6
AST (U/L)	72,03±81,53	0-50
ALT (U/L)	65,34±50,68	1,0-55
GGT (U/L)	161,22±193,89	0-55
ALP (U/L)	192,70±167,34	30-120

Tabla 1: Características clínicas de los pacientes. Las variables continuas están expresadas a través de la media y la desviación estándar. Las variables categóricas están expresadas como n (%).

Expresión génica

En comparación con pacientes sanos, los pacientes cirróticos presentaron 3569 genes diferencialmente expresados. Posteriormente, se hicieron comparaciones con diversos subgrupos: VHC VS Controles Sanos; No VHC VS Controles Sanos; Hepatocarcinoma VS Controles Sanos y No Hepatocarcinoma VS Controles Sanos.

Estos genes forman parte de una serie de rutas que figuran en la siguiente tabla, ordenadas de mayor a menor nivel de significación:

Ruta Canónica	Ratio IP	Genes	Funciones
HIF1 α	2,91	SLC2A5,PIK3C2B,SLC2A1,MMP28,MAPK4,MAPK15,MMP15,NOS3,MAPK12,MAPK11,LDHB,SLC2A3,ARNT,AKT1,EDN1,RBX1,AKT3,PIK3CD,MMP17,VHL,ATM,MMP19	Expresión génica, desarrollo y proliferación celular
IL-15	2,78	PIK3C2B,IL15RA,AXL,MAPK12,MAPK11,RAC3,IL17A,BCL2,PTK2,BCL2L1,AKT1,AKT3,PIK3CD,JAK3,ATM	Desarrollo y función del sistema hematológico, morfología celular y tisular
Interacciones tipo Agrina en la unión neuromuscular	2,71	RAC2,PXN,PAK4,PAK2,ITGA6,ERBB3,MAPK12,RAC3,PTK2,NRG1,ITGB2,PAK1,MUSK,LAMB1,RAPSN,AGRN	Morfología celular, ensamblaje y organización celular, mantenimiento celular
PEDF	2,51	PIK3C2B,MAPK12,PNPLA2,MAPK11,TCF7,BCL2,ROCK2,BCL2L1,HNF1B,AKT1,RHOA,AKT3,DOCK3,PIK3CD,CASP8,ATM	Supervivencia y muerte celular, desarrollo y función del sistema cardiovascular, necrosis hepática/muerte celular

Degradación de Triacilgliceroles	2,33	FAAH,CEL,LIPC,PNLIPRP1,LIPE,NDST2,PNPLA2,PRDX6	Metabolismo lipídico, bioquímica de pequeñas moléculas, transporte molecular
Efrina B	2,32	RAC2,PXN,ITSN1,EPHB2,GNA12,CXCL12,GNG13,GNAZ,RAC3,ROCK2,PTK2,PAK1,RHOA,GNAO1,ACP1,ITSN2	Ensamblaje y organización celular, mantenimiento y función celular, morfología celular
Receptor de Efrina	2,17	RAC2,GRIN2A,ITSN1,EPHB2,PDGFA,CXCL12,GNG13,GRINA,ROCK2,PTK2,PAK1,AKT1,GRIN2C,AKT3,EFNA2,PAK4,PXN,PAK2,ARHGEF15,GNA12,EPHA1,GNAZ,RAC3,GRIN3A,FGF1,EFNA1,PTPN11,RHOA,GNAO1,ACP1	Ensamblaje y organización celular, mantenimiento y función celular, cáncer
DHA	2,16	BCL2L1,PIK3C2B,AKT1,AKT3,PIK3CD,BAX,BCL2A1,PNPLA2,ATM,BCL2	Supervivencia y muerte celular, desarrollo celular, necrosis renal/muerte celular
RhoA	2,15	PLXNA1,SEPT8,PFN1,SEPT9,RHPN1,EPHA1,GNA12,CDC42EP5,ARHGAP4,WASF1,SEPT1,TTN,ARHGAP5,PTK2,ROCK2,IGF1,PLEKHG5,RHOA,PPP1R12B,MYL4,SEPT2,PIP4K2C	Ensamblaje y organización celular, mantenimiento celular, desarrollo Tisular
Apoptosis mediada por Myc	2,12	CDKN2A,PIK3C2B,BAX,MAPK12,PRKCZ,BCL2,MYC,AKT1,IGF1,AKT3,PIK3CD,CASP8,ATM	Supervivencia y muerte celular, morfología del tumor, necrosis renal/muerte celular
Reelina en células neuronales	2,04	MAP3K9,APOE,PIK3C2B,ARHGEF4,ARHGEF15,ITGA6,MAPK12,DAB1,VLDLR,ITGB2,AKT1,ARHGEF16,MAP4K1,PIK3CD,ARHGEF10,ATM	Desarrollo embrionario, función y desarrollo del sistema nervioso, desarrollo de órganos
Efrina A	1,94	ROCK2,PTK2,EFNA2,PIK3C2B,PAK1,PTPN11,EPHA1,RHOA,PIK3CD,ATM,EFNA1	Interacciones célula-célula, ensamblaje y organización celular, desarrollo tisular

CTLA4 en linfocitos T citotóxicos	1,93	CD247,PIK3C2B,AP2A1,AP1M2,HLA-A,PPP2R5B,CD8A,CD8B,AKT1,CD80,PTPN11,FCER1G,AKT3,PPP2R5C,AP1S3,PIK3CD,ATM	Desarrollo celular, función y desarrollo del sistema hematológico, hematopoyesis
Células de Sertoli	1,8	RAC2,MYO7A,TUBB,PTK2,PAK1,AKT1,RHOB,TUBA3C/TUBA3D,TUBB4A,RHOA,ATM,PIK3C2B,MAP3K9,PAK4,PXN,PAK2,TUBA4A,ITGA6,LAMC3,MAPK12,RAC3,EPN2,TUBB8,RHOA,MAP2K3,PIK3CD	Ensamblaje y organización celular, mantenimiento y función celular, morfología celular
Células de carcinoma renal	1,8	PIK3C2B,PAK4,UBB,PAK2,SLC2A1,ARNT,PAK1,AKT1,PTPN11,RBX1,AKT3,PIK3CD,VHL,ATM	Cáncer, desarrollo y función del sistema cardiovascular, desarrollo celular
Biosíntesis del grupo HEMO II	1,78	FECH,ALAD,ALAS2,HMBS	Enfermedades del organismo, enfermedad respiratoria, supervivencia y muerte celular
Guía axonal	1,76	RAC2,PFN1,ITSN1,EPHB2,FZD3,CXCL12,GNG13,SEMA6B,PLCH2,TUBB,PTK2,ROCK2,PAK1,WNT4,MYL4,SRGAP2,GDF7,ATM,ADAMTS4,EFNA2,PIK3C2B,EPHA1,ARHGEF15,PTCH1,GNAZ,RAC3,SRGAP3,ADAM12,PTPN11,RHOA,GNAO1,PIK3CD,ERAP2,UNC5A,PDGFA,ABLIM1,PRKCZ,ADAM21,NFATC1,AKT1,IGF1,GLIS1,TUBA3C/TUBA3D,AKT3,TUBB4A,ACE,UNC5C,BMP1,PLXNA1,PAK4,PXN,PAK2,GNA12,TUBA4A,ADAM20,ROBO3,EFNA1,NTRK2,WNT3A,MAG,TUBB8	Ensamblaje y organización celular, mantenimiento y función celular, morfología celular

Esclerosis Lateral Amiotrófica	1,75	PIK3C2B,GRIN2A,GRID2,GPX1,NEFH,BAX,NAIP,GRIN3A,GRINA,BCL2,BCL2L1,PAK1,IGF1,GRIN2C,GLUL,AKT3,PIK3CD,ATM	Supervivencia y muerte celular,enfermedades neurológicas, reparación, replicación y recombinación del DNA
Activación TR/RXR	1,74	PIK3C2B,CAMK4,SLC2A1,APOA5,DIO2,HP,AKT1,TSHB,NCOA2,SREBF1,AKT3,NCOA4,SYT2,PIK3CD,RCAN2,ATM	Metabolismo de aminoácidos, metabolismo de fármacos, desarrollo y función del sistema endocrino
Biosíntesis de ceramida	1,71	DEGS2,SPTLC3,KDSR	Metabolismo lipídico, metabolismo de ácidos nucleicos
Biosíntesis de Tetrapirrol II	1,71	ALAD,ALAS2,HMBS	Enfermedades neurológicas, respiratorias y del organismo
Angiopietina	1,71	PIK3C2B,PAK4,PAK2,NOS3,PTK2,PAK1,AKT1,PTPN11,GRB7,AKT3,IKBKAP,PIK3CD,ATM	Desarrollo y función del sistema cardiovascular, movimiento celular, desarrollo y función del sistema conectivo
CCR3 en eosinófilos	1,68	PIK3C2B,CALML5,PAK4,CAMK4,PAK2,GN G13,CCL24,MAPK12,MAPK11,PRKCZ,PLA2G2A,ROCK2,PLA2G4E,PAK1,RHOA,PLA2G5,PPP1R12B,PIK3CD,ATM,PLA2G12A	Ensamblaje y organización celular, mantenimiento y función celular, morfología celular
CXCR4	1,65	ADCY4,CD4,CXCL12,GNG13,PRKCZ,ROCK2,PTK2,PAK1,AKT1,RHOB,MYL4,AKT3,RHOF,ATM,PIK3C2B,PAK4,PXN,PAK2,GNA12,GNAZ,MAPK12,RHOA,GNAO1,PIK3CD,ELMO1	Morfología celular, interacciones célula-célula, mantenimiento y función celular

Mecanismos moleculares del cáncer	1,64	CDKN2A,RAC2,FZD3,ADCY4,PTK2,MYC,PAK1,RHOB,E2F2,ATM,PIK3C2B,ARHGEF4,TFDP1,ARHGEF15,PTCH1,RAPGEF3,GNAZ,MAPK12,RAC3,BCL2L1,PTPN11,ARHGEF16,RHOA,GNAO1,LEF1,MAP2K3,PIK3CD,DIABLO,NOTCH1,ARHGEF10,SMAD5,MAPK11,PRKCZ,BCL2,AKT1,FANCD2,AKT3,CASP8,RHOF,BMP1,PAK4,LRP5,PAK2,GNA12,BAX,NAIP,RASGRP1,JAK3,BCL2L11	Supervivencia y muerte celular, ciclo celular, cáncer
Respuesta de fase aguda	1,63	IL6ST,HAMP,SOCS1,SERPING1,IL1F10,MAPK11,IRAK1,C4A/C4B,AKT1,APCS,AKT3,OSM,C3,C1S,AHSG,IL1R1,MAPK12,CRABP1,HP,ORM1,PTPN11,IL1RN,CRABP2,ORM2,MAP2K3,PIK3CD,C2	Movimiento celular, interacciones célula-célula, respuesta inflamatoria
GPTasas de la familia Rho	1,63	SEPT9,CDC42EP5,GNG13,PRKCZ,ROCK2,PTK2,CDH7,STMN1,PAK1,RHOB,MYL4,RHOF,ATM,PIK3C2B,MAP3K9,SEPT8,ARHGEF4,PAK4,PAK2,ARHGEF15,GNA12,WASF1,GNAZ,MAPK12,DES,SEPT1,KIAA1804,RHOA,ARHGEF16,GNAO1,PPP1R12B,PIK3CD,ARHGEF10,PIP4K2C,SEPT2	Organización y ensamblaje celular, mantenimiento y función celular, morfología Celular
Células madre pluripotenciales	1,61	IL6ST,PIK3C2B,LIF,FZD3,SMAD5,MAPK12,MAPK11,TCF7,MYC,WNT3A,AKT1,PTPN11,AKT3,LEF1,PIK3CD,JAK3,ATM	Desarrollo embrionario, desarrollo tisular y de órganos
Wnt/β-cateninas	1,57	CDKN2A,SFRP2,CSNK1G1,FZD3,PPP2R5B,TLE1,KREMEN1,RARG,TCF7,CSNK1E,MYC,AKT1,RARA,AKT3,WNT4,MAP4K1,PPP2R5C,ACVR1C,UBB,AXIN2,LRP5,CSNK1G2,WNT3A,SOX6,GNAO1,NR5A2,LEF1	Expresión génica, desarrollo celular, supervivencia y muerte celular
Reacciones Redox I	1,53	CLIC2,GPX2,GPX1,GPX5,PRDX6	Metabolismo de ácidos nucleicos, bioquímica de pequeñas moléculas, metabolismo de fármacos

Degradación Putrescina III	1,53	ALDH1A1,SAT1,SMOX,ALDH3A1,MAOA	Producción de energía, desarrollo y función del sistema endocrino
IL-17A en células del epitelio respiratorio	1,41	PIK3C2B,AKT1,MUC5AC,AKT3,PIK3CD,CXCL5,MAPK12,JAK3,MAPK11,DEFB4A/DEFB4B,ATM,IL17A	Respuesta inflamatoria, enfermedades hematológicas, movimiento celular
Fc Epsilon RI	1,37	RAC2,PIK3C2B,MAPK12,MAPK11,RAC3,PRKCZ,PLA2G2A,SYNJ2,PLA2G4E,AKT1,PTPN11,PLA2G5,FCER1G,AKT3,MAP2K3,PIK3CD,ATM,PLA2G12A	Señalización celular, transporte molecular, metabolismo de vitaminas y minerales
Papel de IL-17A en la Psoriasis	1,36	S100A8,CXCL5,DEFB4A/DEFB4B,IL17A	Enfermedades dermatológicas, movimiento celular, desarrollo y función del sistema hematológico
Receptor Aril hidrocarbónico	1,35	GSTA3,CDKN2A,NFIC,TFDP1,GSTM5,TP73,TFF1,NQO2,SLC35A2,BAX,RARG,ARNT,TGM2,MYC,ALDH1A1,NCOA2,RARA,ALDH3B1,DCT,ALDH3B2,ALDH3A1,ATM	Expresión génica, supervivencia y muerte celular, ciclo celular
Papel de las quinasas de la familia JAK en la ruta de la IL-6	1,34	IL6ST,SOCS1,PTPN11,OSM,MAPK12,MAPK11	Desarrollo celular, proliferación y crecimiento celular
Células NK	1,33	CD247,RAC2,PIK3C2B,PAK4,PAK2,NCR3,RAC3,PRKCZ,SYNJ2,PAK1,AKT1,PTPN11,FCER1G,AKT3,PIK3CD,KIR2DL4,NCR2,ATM	Interacciones célula-célula, desarrollo y función del sistema hematológico, sistema inmune
Semaphorina en células neuronales	1,32	ROCK2,PTK2,PLXNA1,PAK4,PAK1,PAK2,RHOB,DPYSL4,RHOA,RHOF	Morfología celular, ensamblaje celular

Tabla 2: Rutas diferencialmente expresadas, resultado de la comparación cirróticos terminales vs controles sanos: en este caso, la ruta de IL-15 aparece en segundo lugar.

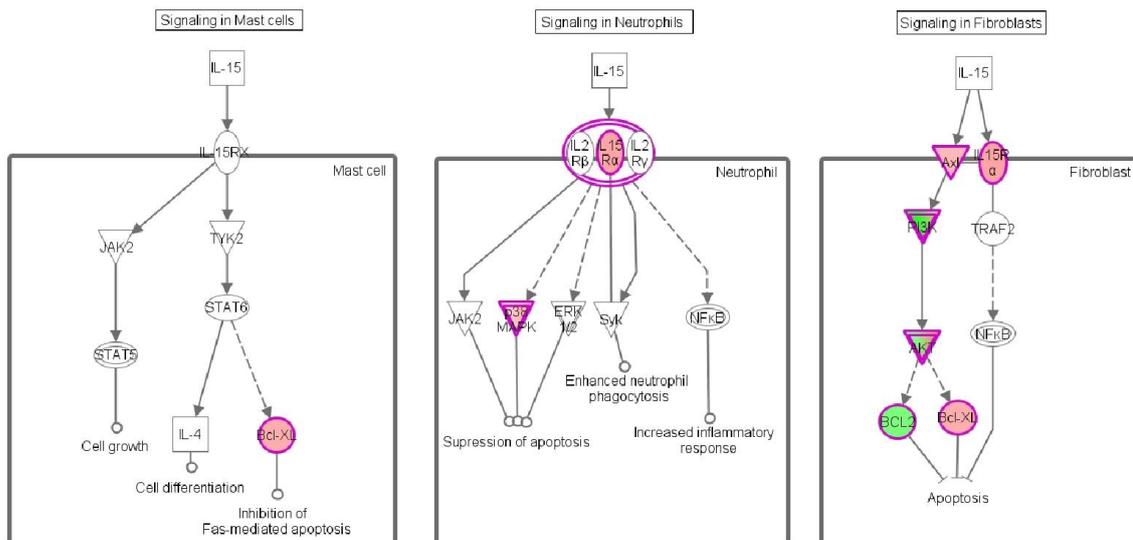
En todas las comparaciones realizadas, la ruta de la Interleuquina 15 aparece sobreexpresada de modo destacado: en la comparación general aparece en segundo lugar por detrás de la ruta de HIF α (Factor Inductor de Hipoxia) mientras que en las comparaciones restantes aparece dentro del grupo de las cinco rutas canónicas más sobreexpresadas.

Ingenuity Pathways Analysis puso de manifiesto que estos pacientes presentaban mayor expresión de los genes implicados en la ruta de la Interleuquina 15: IL15R, un receptor de trasmembrana cuyo *Fold Change*, es decir, nivel de expresión respecto al control era de 4.1, IL17A, una citoquina (3.2), BCL2L1, un transportador (3.6) RAC3, un enzima (3.2) y diversas moléculas: AKT1(6.4), AXL(3.1), JAK3(2.3), MAPK11(2.3), MAPK12(4.4), PIK3C2B(3.5), PIK3CD(2.3) y PTK2(2.4):

Ruta Canónica	Gen	Nombre	FC	Función
IL-15	PIK3C2B	oncogén homólogo v-akt murino timoma viral 1	6,385	Desarrollo y función del sistema hematológico; Morfología celular y tisular
	IL 15RA	oncogén homólogo v-akt murino timoma viral 3	-2,037	
	AXL	mutación ataxia telangiectasia	-4,345	
	MAPK12	receptor tirosin-quinasa AXL	3,143	
	MAPK11	Células B CLL/linfoma 2	-2,149	
	RAC3	BCL2-tipo 1	3,639	
	IL17A	receptor alfa de interleuquina 15	4,075	
	BCL2	interleuquina 17A	3,203	
	PTK2	quinasa Janus 3	2,347	
	BCL2L1	protein-quinasa mitógeno-activada 11	2,296	
	AKT1	protein-quinasa mitógeno-activada 12	4,430	
	AKT3	fosfatidilinositol-4-fosfato 3-quinasa, subunidad catalítica tipo	3,348	
	PIK3CD	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa, subunidad catalítica	2,252	
	JAK3	proteína tirosin-quinasa 2	2,375	
ATM	sustrato 3 relacionado con toxina botulínica C3	3,165		

Tabla 3: genes pertenecientes a la ruta de IL-15 y *Fold Change* (nivel de expresión respecto al control) correspondiente a cada uno de ellos.

IL-15 Signaling



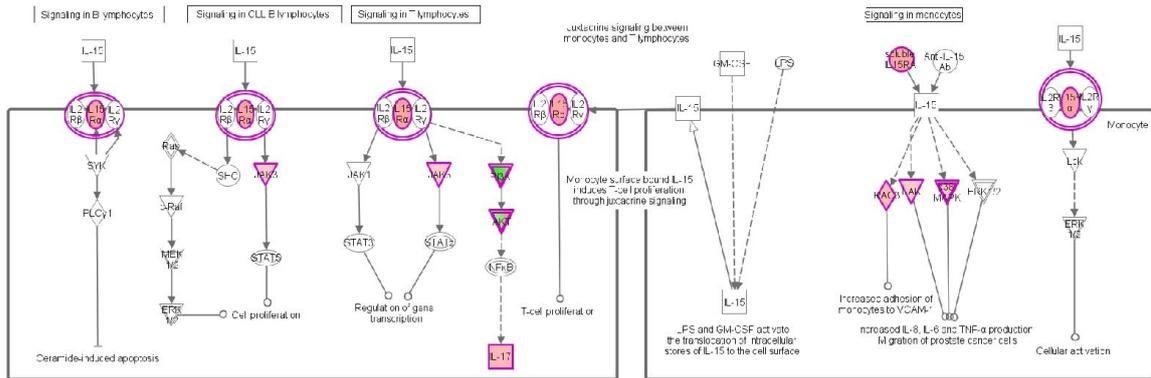


Figura 3: Imagen IPA correspondiente a la ruta del receptor de la Interleuquina 15: los genes sobreexpresados aparecen en color rojo y los infraexpresados en color verde.

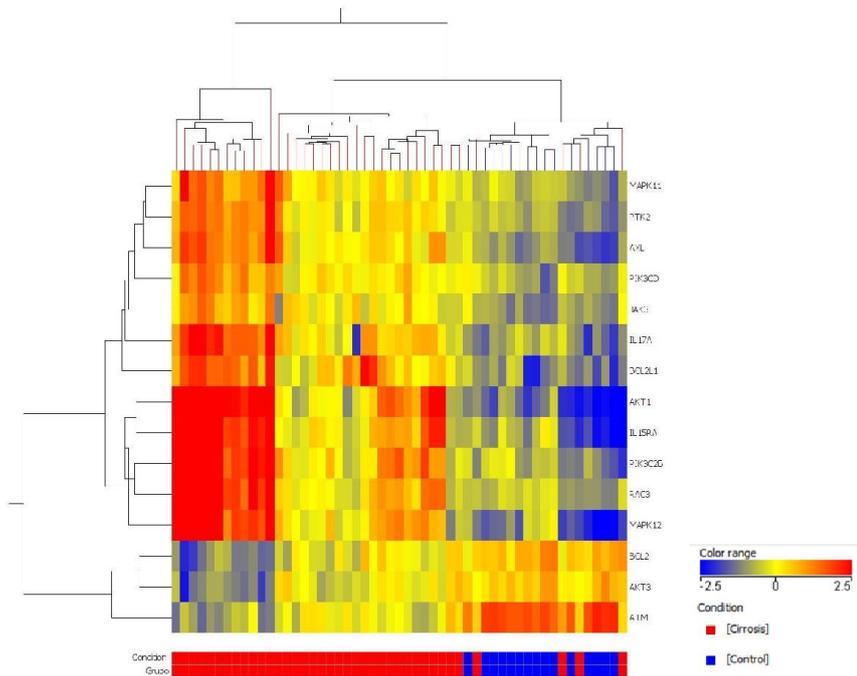


Figura 4: Heat Map donde se muestran los genes de la ruta del receptor de IL-15 agrupados en Clusters.

DISCUSION

El estudio de la huella molecular en pacientes cirróticos pone de manifiesto una activación a nivel sistémico de interleuquinas relacionadas con la respuesta Th1 como son IL-15 e IL-17. La Interleuquina 15 es una citoquina pleiotrópica producida en diversos tejidos. Consta de 114 aminoácidos y un peso molecular de entre 14-15 kDa. Su estructura está formada por 4 α hélices antiparalelas. La Interleuquina 15 es una citoquina perteneciente a la familia de citocinas tipo I, al igual que IL-2 (con la que comparte receptor), IL-3, IL-4 e IL-21.

Esta citoquina fue descrita por primera vez en 1994 (8) como un factor soluble presente en el sobrenadante de cultivo de las líneas celulares HuT-102 y CV-1/EBNA. Desempeña un importante papel en la proliferación, supervivencia y diferenciación de células NK y linfocitos T. Además, promueve el mantenimiento de las células T CD8+CD44hi (células T memoria), activa la fagocitosis e incrementa la respuesta inflamatoria.

Estudios previos ya ponían de manifiesto un incremento en la expresión de citoquinas que participan en la respuesta Th1 en la cirrosis hepática (9): actúan como mediadores de la inflamación crónica y la regeneración: en este caso, se trabajó con muestras de tejido hepático obtenidas en el momento del trasplante y los resultados obtenidos fueron validados mediante RT-PCR. En este mismo artículo, se analizó el perfil de expresión en pacientes que habían sido sometidos a trasplante hepático, aunque estos últimos resultados no fueron nada concluyentes debido a la inmunosupresión de los pacientes. Se observó sobreexpresión de ARNm que codifica para las citoquinas: IL-2, IL-6 e IL-8.

La ruta del receptor de la IL-15 aparece sobreexpresada de modo destacable tanto en la comparación general (cirróticos terminales frente a controles sanos) como en las comparaciones secundarias descritas en los resultados.

Kakumu *et al.* llevaron a cabo una medición en suero de los niveles de IL-15 (junto con IL-10 y receptor de TNF- α) en pacientes VHC positivos, cirróticos y con carcinoma hepatocelular (10). Dicho estudio puso de manifiesto un incremento en los niveles de Interleuquina 15, relacionándola con el grado de inflamación del hígado. Por otra parte, Waldmann TA. relacionó a esta interleuquina y a la IL-2 con enfermedades autoinmunes e infecciones por VHC y HTLV-1 (11). De igual modo, Correia MP *et al* afirman que existe sobreexpresión de IL-15 en hepatocitos en condiciones patológicas, tales como hepatitis y carcinoma hepatocelular (12).

Las diversas comparaciones de nuestro estudio muestran una activación de la ruta del receptor de la Interleuquina 15: sin éste, IL-15 no es capaz de desempeñar sus funciones biológicas, tal y como ponen de manifiesto Bergamaschi *C et al*, donde se concluye que si ésta es secretada de modo aislado, es degradada rápidamente (13,17).

De modo general, la respuesta inflamatoria detectada por nuestros arrays concuerda con datos previos que demostraban una respuesta inmune intrahepática Th17 en pacientes VHC positivos (7) y en pacientes con cirrosis hepática de diferente etiología (18).

Por su parte, la Interleuquina 17 es una glicoproteína homodimérica de 155 aminoácidos y 35 Kd de peso molecular, producida principalmente por un subtipo de células T llamada Th17. Fue descubierta en 1993 y se la ha relacionado con diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, así como con la defensa del huésped contra infecciones bacterianas y fúngicas. Asimismo, induce la expresión de diversas sustancias, tales como: G-CSF, IL-6, quimiocinas, etc. (14).

Wang L. *et al* hablan de una correlación existente entre la expresión de Interleuquina 17 y fibrosis y daño hepático en pacientes portadores de VHB (15). En ese mismo artículo también se menciona a la IL-15 y su papel en la inflamación crónica. Existen además otros estudios - Wu J *et al*. – en los que el aumento de IL-17 en suero se asocia a riesgo de recurrencia temprana tras trasplante hepático (16). Como podemos observar en la ruta del receptor de IL-15 (Figura 3) la interleuquina 17 forma parte de esta ruta y aparece, además, sobreexpresada.

Una de las limitaciones de nuestro estudio fué que los arrays que nos han permitido analizar la huella molecular en pacientes cirróticos corresponden a muestras previas al trasplante: el ARNm se extrae fundamentalmente de leucocitos. Estos pacientes son sometidos a tratamientos con inmunosupresores (a fin de evitar el rechazo en el trasplante) que disminuyen drásticamente la serie blanca. De ahí que la cantidad de ARNm disponible no llegue al mínimo requerido por la técnica y los arrays realizados con muestras pos-trasplante no hayan superado los estándares de calidad mínimos para ser utilizados. En futuros estudios, sería interesante disponer de muestras pos-trasplante que nos permitan conocer que es lo que ha sucedido a nivel sistémico tras el TOH.

En definitiva, todos estos estudios ponen de manifiesto que la expresión de estas citoquinas se asocia con *progresión a cirrosis* y podrían, por tanto, actuar como *marcadores de pronóstico* en estos pacientes (19).

CONCLUSIONES

Las conclusiones de nuestro trabajo fueron las siguientes:

1. Los pacientes con cirrosis terminal muestran sobre-expresión de genes de la ruta de la IL-15 en sangre periférica, destacando el receptor de la Interleuquina 15 y la Interleuquina 17.
2. La activación de estas rutas se produce a nivel sistémico, puesto que las muestras obtenidas corresponden a sangre periférica.
3. Estos resultados sugieren un papel principal para la IL-17 y el receptor de la IL-15 en los eventos patogénicos que conducen a la cirrosis hepática (respuesta Th17).
4. La expresión de estos genes podría ser empleada como marcador pronóstico y de este modo monitorizar la progresión a cirrosis.

BIBLIOGRAFIA

1. L. García *et al.* Actualización en Cirrosis Hepática; *Medicine* (2012); 11(11); 625-633.
2. OPTN & SRTR Anual Data Report 2011: Liver: (2011); 73-102.
3. Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation; *Fam Physician* (2006); 74(5):756.
4. Anthony PP *et al.* Conversion of micronodular cirrhosis into macronodular cirrhosis. *Clin Pathol.* 1978; 31(5):395.
5. Van de Water J *et al.* Detection of autoantibodies to recombinant mitochondrial proteins in patients with primary biliary cirrhosis: *N Engl J Med.* 1989; 320(21):1377.
6. Universidad Santiago de Compostela. Unidad de Expresión Génica-Tecnología Affymetrix:<http://www.usc.es/es/investigacion/riaidt/secuenciacion/affymetrix>
7. Nicholas A. Shackel *et al.* Insights into the Pathobiology of Hepatitis C Virus-Associated Cirrhosis Analysis of Intrahepatic Differential Gene Expression. *American Journal of Pathology*: Volume 160; 2(2002): 641–654.
8. Grabstein KH *et al.* Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 1994 May 13;264(5161): 965-8.

9. Geoffrey W. McCaughan *et al.* Molecular pathogenesis of liver disease: an approach to hepatic inflammation, cirrhosis and liver transplant tolerance. *Immunological Reviews* 174/2000.
10. Kakumu *et al.* Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptors in type C chronic liver disease *Clin. Exp. Immunol.* 109,458-463.
11. Waldmann TA *et al.* The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2006;6:595–601.
12. Correia MP *et al.* Hepatocytes and IL-15: a favorable microenvironment for T cell survival and CD8+ T cell differentiation. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):6149-59.
13. Bergamaschi C *et al.* Intracellular Interaction of Interleukin-15 with Its Receptor α during Production Leads to Mutual Stabilization and Increased Bioactivity, *J Biol Chem.* 2008 Feb 15;283(7):4189-99. Epub 2007 Nov 30.
14. Rouvier, E., Luciani, M. F., Mattei, M. G., Denizot, F., & Golstein, P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* (1993), 150(12), 5445–5456.
15. Wang L. *et al.* IL-17 expression is correlated with hepatitis B-related liver diseases and fibrosis, *Int J Mol Med* 2011 Mar;27(3):385-92.
16. Wu J, Du J, Liu L, Li Q, Rong W, *et al.* Elevated Pretherapy Serum IL17 in Primary Hepatocellular Carcinoma Patients Correlate to Increased Risk of Early Recurrence after Curative Hepatectomy (2012), *PLoS ONE* 7(12).

17. Bergamaschi C *et al.* Intracellular Interaction of Interleukin-15 with Its Receptor α during Production Leads to Mutual Stabilization and Increased Bioactivity, *J Biol Chem.* 2008 Feb 15;283(7):4189-99. Epub 2007 Nov 30.
18. Suzuki, A., S. McCall, S. S. Choi, J. K. Sicklick, J. Huang, Y. Qi, M. Zdanowicz, T. Camp, Y. X. Li, A. M. Diehl. 2006. Interleukin-15 increases hepatic regenerative activity. *J. Hepatol.* 45: 410-418.
19. Gehrau RC, Archer KJ, Mas VR, Maluf DG (2012) *Molecular Profiles of HCV Cirrhotic Tissues Derived in a Panel of Markers with Clinical Utility for Hepatocellular Carcinoma Surveillance.* PLoS ONE 7(7).