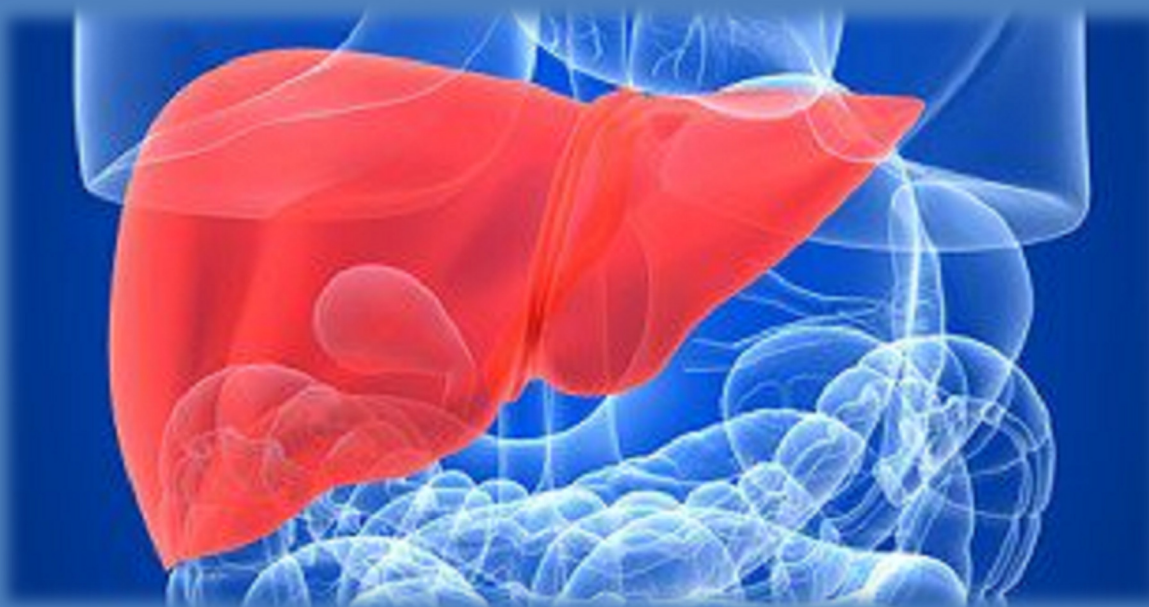




Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA, BIOLOGÍA
CELULAR Y FARMACOLOGÍA**



**RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE
PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS**

TESIS DOCTORAL:

M^a PILAR BUENO REQUENA

VALLADOLID, 2016



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y FISIOLÓGÍA**

TESIS DOCTORAL:

**RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE
PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS**

**Presentada por M^a del Pilar Bueno Requena para optar al grado
de doctora por la Universidad de Valladolid**

Dirigida por:

Jesús Fco. Bermejo Martín y Gloria Sánchez Antolín

D. JESÚS FCO. BERMEJO MARTÍN, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA,
ESPECIALISTA DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA, INVESTIGADOR PRINCIPAL DE LA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INFECCIÓN E INMUNIDAD -IMI- DEL
SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA EN EL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE
VALLADOLID-IECSCYL.

D^a. GLORIA SÁNCHEZ ANTOLÍN, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA,
ESPECIALISTA EN APARATO DIGESTIVO, JEFE DE LA UNIDAD DE DIGESTIVO DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO RIO HORTEGA. PROFESOR ASOCIADO APARATO
DIGESTIVO UNIVERSIDAD DE VALLADOLID.

CERTIFICAN QUE:

D^a. M^a del Pilar Bueno Requena ha realizado bajo su dirección el trabajo que
presenta para optar al grado de Doctor con el título:

“Respuesta activa profibrótica en sangre periférica en pacientes cirróticos”

Examinado dicho trabajo, damos nuestra conformidad para su presentación y
defensa como Tesis Doctoral.

Valladolid, julio de 2015.

Dr. Jesús Fco. Bermejo Martín

Dra. Gloria Sánchez Antolín

A mi familia

A mi director de tesis, Jesús, un investigador con mayúsculas que contagia a todos los que le rodean con su pasión por la investigación. De Jesús he aprendido infinidad de cosas que creo que no es posible plasmar en este breve agradecimiento.

A mi directora Gloria, que ha sido una fuente inagotable de conocimientos sobre hepatología, un campo hasta ahora desconocido para mí. Gracias por saber tanto criticar el trabajo que no está bien hecho, como reconocer y felicitar cuando sí lo está.

A las “chicas del laboratorio”, Lucía, Verónica y Alicia. Parte imprescindible de esta tesis no solo por su inmenso trabajo en el laboratorio sino por estar siempre disponibles y con una sonrisa para aclararme cualquier duda, hacéis un trabajo muy grande que seguramente muchas veces no es reconocido, que sepáis que no me olvido de vosotras y que tengo muy presente que sois parte esencial de esta tesis.

Gracias a la Dra Raquel Almansa, por tu paciencia en mis salientes de guardia y por haberme ayudado en todos los pasos desde el principio hasta el final de esta Tesis.

Dentro del Servicio de Análisis Clínicos son tantas las personas que se han interesado en este trabajo que no puedo mencionar a todas. No obstante, me gustaría hacer una mención especial para mis compañeras residentes: Raquel, Cristina y Wysali. No me puedo olvidar de Jose, residente adoptado de microbiología y que yo considero como uno más del laboratorio.

No aparece como directora, pero podría hacerlo perfectamente la Dra. Dolores Calvo, que me ha impulsado en todos los proyectos acometidos durante los cuatro años que hemos compartido en el Servicio de Análisis Clínicos. Gracias por tener siempre tiempo para mí cuando lo necesitaba, solo espero no haber abusado de tu paciencia.

A mi familia, mis padres y hermano, que siempre me animaron a estudiar, que me dieron la libertad de elegir y las alas para poder volar hacia este objetivo, cuyo origen viene de mucho más atrás de los varios años que ha llevado completar este proyecto. Espero que os sintáis tan orgullosos de esto como yo porque ha sido un esfuerzo común el que ha hecho posible esta tesis. Sin vosotros no hubiese sido posible.

Índice

Abreviaturas

Resumen

Introducción

1. Epidemiología

2. Etiología y clasificación

Anatomopatológica

Clínica

Cirrosis compensada

Cirrosis descompensada

3. Alteraciones en parámetros de laboratorio

4. Diagnóstico por imagen

Fibroscan®

5. Complicaciones

6. Hepatocarcinoma

7. Índices pronóstico

8. Alteraciones intrahepáticas

Inflamación

Fibrosis

9. Tipos celulares

Células hepáticas estrelladas

Células endoteliales sinusoidales

Células Kupffer

Hepatocitos

10. Papel de las citoquinas en la fibrosis y la cirrosis

Factor de crecimiento derivado de plaquetas

Factor De Crecimiento Transformante Tipo β

Factor de Necrosis Tumoral tipo α

Interferón

Interleuquinas: profibrogénicas y antifibrogénicas

11. Cirrosis hepática y Sistema Inmune

Implicación del Sistema Inmune

Activación Sistémica

12. Tratamiento de la fibrosis y la cirrosis

Terapias basadas en el tratamiento etiológico

Antiinflamatorios e inmunosupresores

Actividad inmunosupresora y apoptosis en células hepáticas estrelladas

Función protectora y regeneración hepática

Terapia génica y terapia dirigida

13. Cirrosis hepática y expresión génica

Hipótesis y objetivos

Material y métodos

1. Diseño

Criterios de inclusión y exclusión

Población control

Comité de ética. Consentimiento informado

Muestras recogidas

3. Recogida de datos

Datos clínicos

Parámetros de laboratorio

Análisis estadístico

4. Perfiles de expresión génica. Transcriptómica

Protocolo de trabajo:

Extracción ARN total

Evaluación calidad y cantidad de ARN total

Amplificación y marcaje

Evaluación de la concentración, integridad y rendimiento del ARNc

Hibridación

Procesado de la imagen y extracción de datos

Análisis bioinformático

Evaluación de los resultados

Análisis estadístico

Resultados

1. Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes:

Pacientes con/sin hepatocarcinoma

Presencia/ausencia de rechazo agudo leve

2. Evaluación de los perfiles de expresión génica

Análisis bioinformático

Comparación de los niveles de expresión génica entre pacientes y controles

Identificación de rutas de señalización intracelular del cirrótico terminal

Discusión

1. Estudio de los factores clínicos asociados a cirrosis terminal

Factores de riesgo

Parámetros de laboratorio

2. Estudio de la huella molecular

Rutas implicadas en fibrogénesis hepática

Rutas relacionadas con alteraciones en el metaboloma

Rutas relacionadas con alteraciones cardiacas en la cirrosis

Otras rutas destacadas en el análisis

Expresión de interleuquinas

Otros aspectos del análisis

3. Modelo de patogénesis en la cirrosis terminal

Conclusiones

Rendimiento científico

Anexos

Bibliografía

Abreviaturas

Abreviaturas

AASLD American Association for the Study of Liver Diseases	complementario de doble cadena
ADN Ácido desoxirribonucleico	EASL European Association for the Study of the liver
ADNc Ácido desoxirribonucleicocomplementario	ECA Enzima Conversora de Angiotensina
ALT Alanino aminotransferasa	EDN Endotelina
AMPc Adenosin-monofosfato cíclico	EDTA Ácido etilendiamino tetraacético
ARN Ácido ribonucleico	EHNA Enfermedad por hígado graso no alcohólico
ARNc Ácido ribonucleicocomplementario	EPOC Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
AST Aspartato aminotransferasa	ET Elastografía de transición
ATP Adenosin-trifosfato	FA Fosfatasa alcalina
CAMs Moléculas de adhesión celular	FAM Fluoresceína
CTP Citidina trifosfato	FC Valor de cambio (<i>Fold Change</i>)
DAVID Base de datos de anotación, visualización y descubrimiento integrado (<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>)	GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
ddPCR Reacción en cadena de la polimerasa digital en gotas (<i>droplet digital Polymerase Chain Reaction</i>)	G-CSF Factor estimulante de colonias de macrófagos
DE Desviación estándar	GPVH Gradiente de presión venosa hepática
DM-II Diabetes Mellitus tipo 2	HCC Hepatocarcinoma
dsADN Ácido desoxirribonucleico	HCM Miocardiopatía hipertrófica
	HSCs Células Hepáticas Estrelladas
	HTA Hipertensión arterial
	IFN Interferón

IL Interleuquina

INR Ratio InteARNmcional Normalizado

KEGG Enciclopedia Kyoto de genes y genomas (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

MEC Matriz extracelular

MELD Model for end-stage liver disease

MMP Metaloproteinasa

NCBI Centro nacional de información para biotecnología (*National Center for Biotechnology Information*)

NK Natural Killer

nm Nanómetro

NO Óxido nitroso

NTP Nucleósido trifosfato

OD Correlación de la Absorbancia

OMS Organización Mundial de la Salud

PAAF Punción-aspiración con aguja fina

PBMCs Células mononucleares periféricas

PCA Análisis de Componentes Principales

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PEG Perfil de expresión génica

ppb Partes por billón

RAL Rechazo agudo leve

RIN Número de integridad de ARN

ROS especies reactivas de oxígeno

SA Actividad específica

TAC Tomografía Axial Computerizada

TGF- β Factor de crecimiento de fibroblastos tipo beta

TIMP Inhibidor tisular de metaloproteinasas

TIPS shunt portosistémico intrahepático transyugular

TIV transcripción in vitro

TNF- α Factor de necrosis tumoral tipo alfa

TOH Trasplante Ortotópico de hígado

UNOSRed InteARNmcional de distribución de órganos (*United Network for Organ Sharing*)

VHB Virus de la hepatitis B

VHC Virus de la hepatitis C

γ -GT Gamma-glutamyltranspeptidasa

Resumen

Resumen

La cirrosis representa el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas (1, 2). Su etiología varía geográficamente: el alcoholismo, la infección por el virus de la hepatitis B y C y la enfermedad por hígado graso no alcohólico representan las principales causas.

En el pasado se consideraba a la cirrosis un proceso irreversible. Sin embargo, desde hace unos años, esta entidad ha pasado de ser un proceso *estático* a convertirse en un proceso *dinámico*: hoy en día se sabe que, cuando se elimina la causa fundamental que produce la cirrosis, ésta puede revertir, como cuando se elimina el virus de la hepatitis C o cesa el consumo de alcohol (7, 8). El desarrollo de fibrosis se considera el estadio previo a la aparición de cirrosis. Actualmente, las estrategias empleadas en su tratamiento son parcialmente útiles, debido fundamentalmente al desconocimiento que hoy en día existe de los mecanismos moleculares que conducen a su aparición.

Por otra parte, el papel del sistema inmunitario en la patogénesis de la cirrosis aun no está bien caracterizado. El análisis de perfiles transcriptómicos en sangre periférica representa una aproximación de fácil acceso a la hora de obtener una visión global de la respuesta inmune a nivel sistémico.

Hemos estudiado los perfiles de expresión génica en sangre periférica de 30 pacientes cirróticos terminales y los hemos comparado con 8 controles sanos. La mayoría de estos pacientes eran hombres ($n = 21$, 70%) de mediana edad (57.4 ± 6.8 años). El abuso de alcohol fue la causa más frecuente de cirrosis ($n = 22$, 73%). Además,

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

once pacientes presentaban carcinoma hepatocelular (36.7%), nueve presentaron rechazo agudo leve y ocho pacientes estaban infectados por el virus de la hepatitis C (26.7%). Hemos encontrado una huella transcriptómica compuesta por 3402 genes diferencialmente expresados al realizar la comparación de pacientes frente a controles sanos (2802 sobreexpresados y 600 infraexpresados). El análisis de estos hallazgos pone de manifiesto la existencia de una respuesta activa profibrótica programada en pacientes cirróticos, la cual integra rutas como: Factor de crecimiento de fibroblastos, interacción matriz extracelular-receptor y moléculas de adhesión celular, entre otras.

Así mismo, existen alteraciones en otras rutas que participan en el metabolismo de glicina, serina, treonina, fenilalanina, tirosina, transportadores ABC, purinas, ácido araquidónico, relacionadas con alteraciones cardíacas, etc. Por tanto, nuestros resultados sugieren la coexistencia en sangre periférica de una respuesta genómica que implica actividad profibrótica y alteraciones metabólicas en cirrosis avanzada.

En definitiva, una mayor comprensión de su patogénesis facilitaría el desarrollo de opciones terapéuticas más efectivas: la monitorización de los niveles de expresión de estos genes podría ser de utilidad a la hora de predecir/monitorizar la evolución a cirrosis. Por tanto, estos genes constituirían dianas terapéuticas en el tratamiento de esta enfermedad.

Introducción

Introducción

La cirrosis hepática representa el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas (1, 2). Es un proceso difuso caracterizado por la pérdida de parénquima hepático, formación de septos fibrosos y de nódulos de regeneración que distorsionan la arquitectura y anatomía vascular normal (3).

1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA CIRROSIS

La etiología de la cirrosis varía geográficamente: el alcoholismo, la infección por el virus de la hepatitis C y la enfermedad por hígado graso no alcohólico representan las principales causas en países occidentales, mientras que la infección por el virus de la hepatitis B es la principal causa de cirrosis en la región Asia-Pacífico (4). Según la Organización Mundial de la Salud, anualmente mueren más de 800.000 personas por esta enfermedad, siendo la sexta causa de muerte más frecuente en el mundo (5). En España se estima una prevalencia de entre el 1 y el 2%, y es más frecuente en varones a partir de los 50 años.

2. ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DE LA CIRROSIS

Son diversas las causas que conducen a la aparición de cirrosis, ya sea como consecuencia de una inflamación hepática crónica o debido a colestasis. En los países desarrollados la hepatitis C se ha convertido ya en la primera causa de enfermedad hepática crónica, seguida del consumo de alcohol, representando ambas

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

aproximadamente el 50% del total de pacientes en lista de espera de trasplante hepático durante el 2013 (5).

No obstante, existen numerosas causas que pueden desencadenar cirrosis hepática, entre las principales se encuentran (3):

- Virus de la hepatitis B, hepatitis C y hepatitis D (los virus de la hepatitis son la causa de cirrosis más habitual en la actualidad).
- Consumo excesivo de alcohol (sigue siendo todavía la causa del 40% de los casos de cirrosis).
- Enfermedad por hígado graso no alcohólico, también llamada esteatohepatitis no alcohólica. Es una condición frecuente en la población general debido al cambio de hábitos alimentarios y al sedentarismo. Está asociada a diabetes y obesidad.
- Enfermedades autoinmunes, como la hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria o colangiopatía autoinmune.
- Enfermedades hereditarias o congénitas como la hemocromatosis, fibrosis quística o la enfermedad de Wilson.
- Obstrucción prolongada del conducto biliar, como pasa en la colangitis esclerosante.
- Ausencia de proteínas específicas o enzimas para metabolizar diferentes sustancias en el hígado, como la deficiencia de alfa-1-antitripsina.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

- Causa vascular: insuficiencia cardíaca crónica derecha (“cirrosis cardíaca”), pericarditis constrictiva crónica o el síndrome de Budd-Chiari.
- Inducida por fármacos: arsénico, metotrexato, isoniazida, amiodarona, α -metildopa, tetracloruro de carbono, etc.
- Criptogénica.

De forma similar a lo que acontece en otros tejidos, la inflamación hepática es un proceso necesario en la reparación tisular. En condiciones normales, este tipo de respuesta restaura la estructura y funciones del hígado, manteniendo la homeostasis tisular. Sin embargo, cuando la lesión es demasiado intensa o persistente, el propio proceso inflamatorio compromete la integridad estructural del órgano, dando lugar a la formación excesiva de matriz extracelular (fibrosis), con posterior esclerosis (7). El exceso de matriz se acumula en la zona perisinusoidal, formándose una barrera que impide la correcta difusión de oxígeno y nutrientes a través del hígado, provocando la muerte celular de los hepatocitos. Esto conduce a la distorsión de la arquitectura lobular normal del parénquima hepático y de la red vascular, derivando en la formación de nódulos de regeneración, que definen la enfermedad histológicamente (Figura 1).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

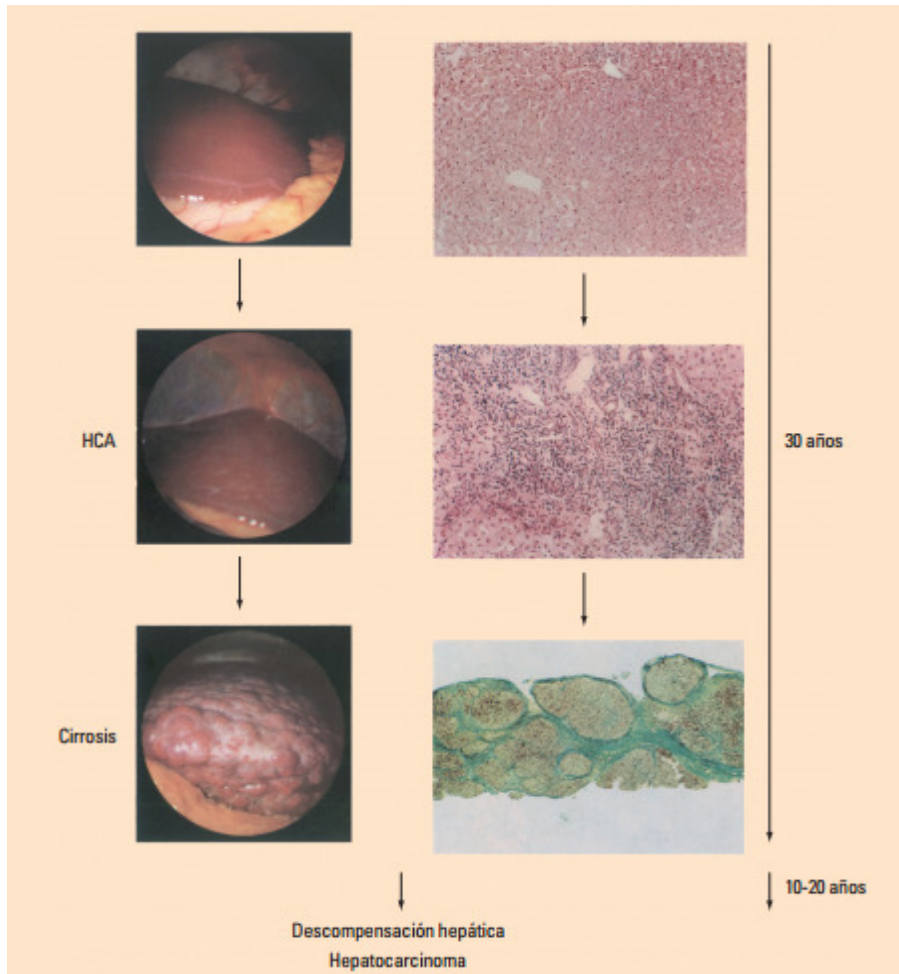


Figura 1. Progresión de la lesión hepática en la hepatitis crónica. HCA: hepatitis crónica activa.
García Buey, L (2012) Cirrosis hepática [Medicine. 2012].

La inflamación intrahepática y respuesta inmune son fenómenos clave en la génesis de la cirrosis (4). Ambas generan un daño directo en los hepatocitos que se traduce en la activación de las Células Hepáticas Estrelladas (HSCs), que conducen en último lugar a la aparición de fibrosis hepática (7).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Clasificación anatomopatológica

El proceso pasa por diferentes etapas histológicas que se han denominado de diferentes maneras, pero la clasificación más empleada en la actualidad es la METAVIR, que la clasifica en cuatro etapas: F0, que representa la falta de fibrosis; F1, fibrosis portal; F2, fibrosis periportal; F3, con puentes de fibrosis y finalmente F4, con nódulos de regeneración. En este contexto, una vez que se alcanza la última etapa, la cirrosis queda establecida y el proceso se considera finalizado desde el punto de vista patológico (Figura 2).

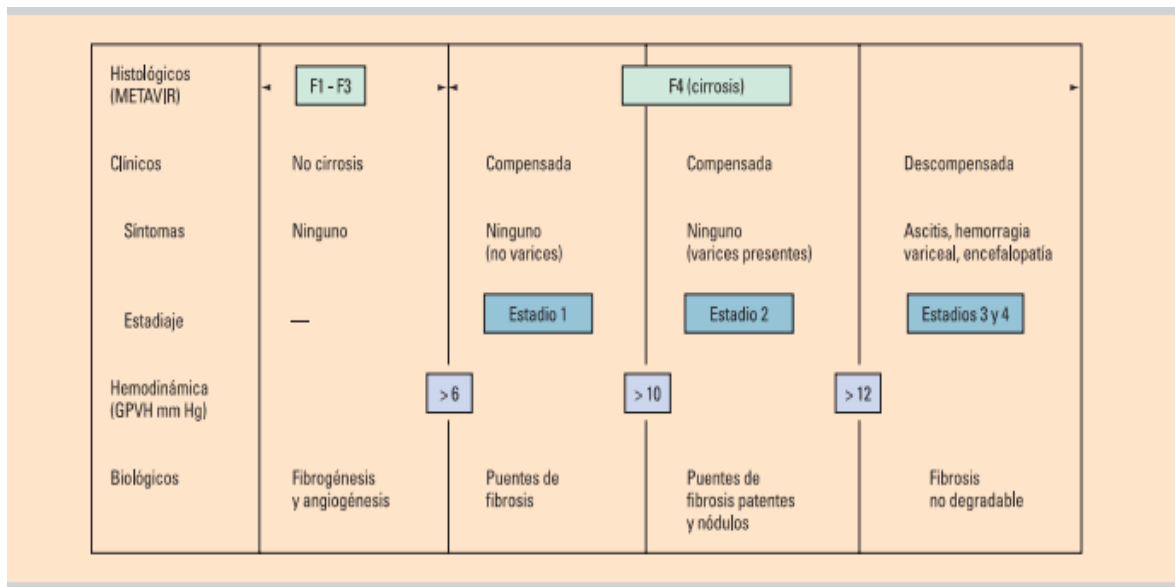


Figura 2. Clasificación de la enfermedad hepática crónica basada en parámetros histológicos, clínicos, hemodinámicos y biológicos. GPVH: gradiente de presión venosa hepática.

Modificación de Friedman SL et al para García Buey, L (2012) Cirrosis hepática [Medicine. 2012].

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Clasificación desde el punto de vista clínico

En la evolución de la enfermedad podemos distinguir dos fases: cirrosis compensada y descompensada. Se trata de una clasificación simple y reproducible e identifica a pacientes con una tasa de progresión de la enfermedad y supervivencia similares (Tabla 1).

Síntomas/signos	Exploración	Pruebas de imagen
Anorexia	Hepatomegalia	Nódulos superficiales
Pérdida de peso	Esplenomegalia	Aumento ecogenicidad (ultrasonido)
Debilidad	Telangiectasia/arañas vasculares	Atrofia del lóbulo derecho
Fatiga	Eritema palmar	Hipertrofia del lóbulo caudado e izquierdo
Calambres musculares	Acropaquia	Hígado pequeño, nodular
Hematomas	Osteoartropatía hipertrófica	Ascitis
Amenorrea/oligomenorrea/metrorragia (mujer)	Contractura de Dupuytren	Carcinoma hepatocelular
Impotencia, disminución de la libido (varón)	Bandas de Muehrcke en uñas	Trombosis portal/esplénica/mesentérica superior
Infertilidad	Agrandamiento de la glándula parótida (inducido por alcohol)	Circulación colateral portosistémica
Ictericia	Ginecomastia (varón)	
Orina oscura	Pérdida de vello axilar/pecho (varón)	
Prurito	Atrofia testicular (varón)	
Hematemesis/melenas	Caput medusa (venas cutáneas dilatadas alrededor del ombligo)	
Hematoquezia	Murmullo Cruveilhier-Baumgarten	
Distensión abdominal	Ascitis	
Edema de las extremidades inferiores	Asterixis	
Somnolencia/confusión	Fetor hepático	

Tabla 1: Síntomas y signos, hallazgos a la exploración y radiológicos que caracterizan a la cirrosis hepática

Cirrosis compensada

El curso de la cirrosis compensada no se conoce con exactitud debido al carácter prácticamente asintomático de esta fase. Los factores pronóstico de mortalidad que se identifican con una mayor frecuencia en esta fase se relacionan con la presencia de hipertensión portal (recuento de plaquetas, tamaño del bazo o presencia de varices). Probablemente, estos factores pronóstico identifican a los pacientes con mayor riesgo de desarrollo de complicaciones características de la fase descompensada de la enfermedad. La transición de estadio compensado a descompensado ocurre con una incidencia de un 5-7% por año. A su vez, esta fase se subdivide en estadios 1 y 2 según la ausencia o presencia de varices (hipertensión portal clínicamente significativa).

Cirrosis descompensada

La cirrosis descompensada comprende los estadios 3 y 4 y se define por la presencia de ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía hepática y/o la aparición de ictericia. La ascitis es la complicación que marca el inicio de la fase de cirrosis descompensada en la mayoría de los casos; por tanto, se considera el signo clave. Una vez alcanzada esta fase, el pronóstico con respecto a la supervivencia empeora de un modo drástico, con una supervivencia al año y a los dos años del 61 y 50% respectivamente, y una supervivencia a los 10 años del 7% (9). La identificación de factores pronóstico de mortalidad en la fase descompensada es de gran relevancia, ya que estos pacientes son los que tienen mayor riesgo de muerte.

3. ALTERACIONES EN PARÁMETROS DE LABORATORIO

Respecto a alteraciones en las pruebas de laboratorio destaca la elevación en suero de los siguientes parámetros: bilirrubina, aminotransferasas, albúmina, fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltanspeptidasa; tiempo de protrombina e INR. De igual modo son frecuentes la hiperbilirrubinemia, hiponatremia, hipoalbuminemia y trombocitopenia (9, 10). La alteración de estos parámetros de modo aislado no es suficiente para diagnosticar patología hepática. Sin embargo, su capacidad diagnóstica aumenta en combinación con técnicas de imagen (11, 12).

Ante la sospecha de enfermedad hepática, se recomienda la realización de un hemograma, pruebas de coagulación (tiempo de protrombina), determinación de enzimas hepáticas: aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA) y gamma-glutamiltanspeptidasa (γ -GT) y otros parámetros serológicos tales como: bilirrubina (total, directa e indirecta) y albúmina.

PARÁMETRO DE LABORATORIO	DESCRIPCIÓN	CAUSA
GOT y GPT	Normales o moderadamente elevadas	Daño en los hepatocitos; una ratio AST/ALT > 1 es frecuente en cirrosis alcohólica (déficit relativo de vitamina B6).
ALP		Colestasis
GGT	Más específica que ALP en patología hepática. Elevada en alcoholismo activo.	Colestasis
Bilirrubina	Se eleva tras el aumento de ALP y GGT. Importante predictor de mortalidad.	Colestasis, función renal y hepática disminuida (exacerbado por la inflamación sistémica).
Tiempo protrombina	Disminuida en cirrosis avanzada	Producción hepática disminuida de los factores V/VII (mientras la producción de trombina se mantiene); déficit de vitamina K.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Inmunoglobulinas	Incrementadas (principalmente IgG)	Transporte venoso portal de antígenos a tejidos linfáticos con estimulación resultante de las células plasmáticas (13).
Balace de sodio	Hiponatremia	Incapacidad de excreción de agua a través de los riñones debido a una actividad incrementada de la hormona antidiurética (14).
Anemia	Micro, macro o normocítica	Déficit de folatos, hiperesplenismo, toxicidad directa (alcohol), pérdidas de sangre gastrointestinales (p.e. por varices esofágicas).
Plaquetas y leucocitos	Trombocitopenia y leucopenia	Hiperesplenismo, disfibrinogenemia, disminución de la producción hepática de Trombopoyetina (15).
Albúmina	Disminuida en cirrosis avanzada	Producción hepática disminuida, secuestro en el espacio intersticial y ascítico, malnutrición, enteropatía con pérdida de proteínas.

Tabla 2: Hallazgos de laboratorio en la cirrosis

4. DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

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.

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

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

confirmación del diagnóstico, ya que de este modo se puede apreciar claramente la arquitectura del hígado al completo (Figura 3) (16).

En la práctica clínica, los procedimientos más usuales para realizar la biopsia hepática son: biopsia percutánea, biopsia transyugular, 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 (16).

La biopsia percutánea obtiene mejores muestras que la biopsia transyugular, pero esta última se realiza en los casos de deterioro importante de la coagulación ya que disminuye los riesgos de hemorragia.

Aunque la biopsia hepática es la prueba definitiva para la confirmación del diagnóstico, ya que de este modo se puede apreciar claramente la arquitectura del hígado al completo (Figura 3) (16) en la práctica clínica no siempre es necesaria ya que la combinación de los datos clínicos, los test de laboratorio y los resultados de las pruebas de imagen tienen una alta sensibilidad y especificidad para diagnosticar la cirrosis sin necesidad de confirmación anatomopatológica, dado que en estadios avanzados, la biopsia es una técnica con riesgos asociados al deterioro de la coagulación y la trombopenia. Por otro lado, esta confirmación diagnóstica no modifica la actitud terapéutica con el paciente y tampoco está justificado el riesgo de la biopsia solo para confirmar el diagnóstico.

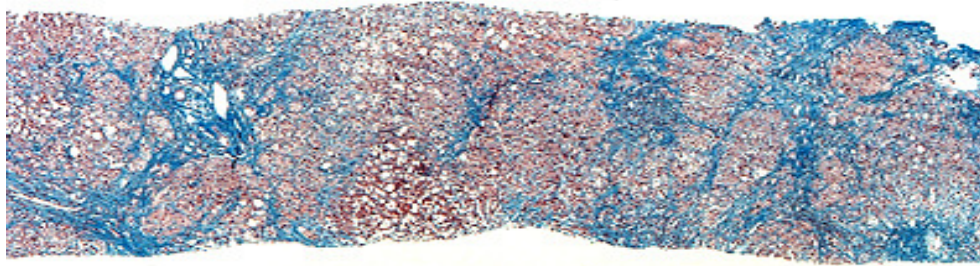


Figura 3: Biopsia hepática obtenida mediante tru-cut (40x) de una paciente de 61 años con obesidad, diabetes e hiperlipemia y que presentaba elevación de transaminasas en suero. La biopsia muestra una fibrosis parcheada (azul), infiltrados peri-portales inflamatorios y una marcada esteatosis. Estos hallazgos son compatibles con una cirrosis secundaria a esteatohepatitis no alcohólica.

Jeremy Ditelberg, MD

En algunas ocasiones, la biopsia hepática puede estar justificada para orientar hacia la etiología de la cirrosis: especialmente cuando ésta es metabólica (hepatitis autoinmune, hemocromatosis, esteatohepatitis no alcohólica, hepatitis colestásica no alcohólica, Enfermedad de Wilson y déficit de α -1-antitripsina, entre otras) (17) y se puede tratar de alguna manera.

5. UTILIDAD DEL FIBROSCAN®

Una alternativa no invasiva de reciente aparición a la hora de evaluar el grado de fibrosis hepática es la elastografía de transición (ET) o Fibroscan® (18). Esta técnica se basa en la medición de la rigidez o elasticidad de un tejido y utiliza un pulso mecánico de vibración y una onda de ultrasonidos. Se mide la velocidad de propagación de esa

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

onda que será proporcional a la rigidez del tejido (cuanto más duro es el tejido, más rápido se propaga la onda). El resultado se expresa en unidades de Kilopascal (kPa) (19).

El método comercializado que utiliza la ET para medir la rigidez del hígado se denomina Fibroscan® (Echosens, París, Francia). Permite conocer la rigidez hepática mediante una exploración no invasiva, rápida, fácil, fiable y que ofrece un valor cuantitativo proporcional al grado de fibrosis hepática (Figuras 4 y 5):

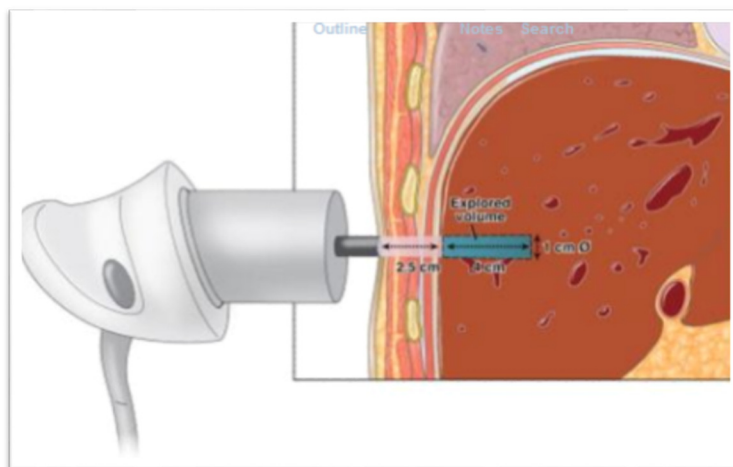


Figura 4: Áreas representativas del parénquima hepático examinado por elastografía transitoria para detectar el estadio de fibrosis hepática.

Modificación de Talwalkar JA, "Elastography for Detecting Hepatic Fibrosis: Options and Consideration". Gastroenterology 2008.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

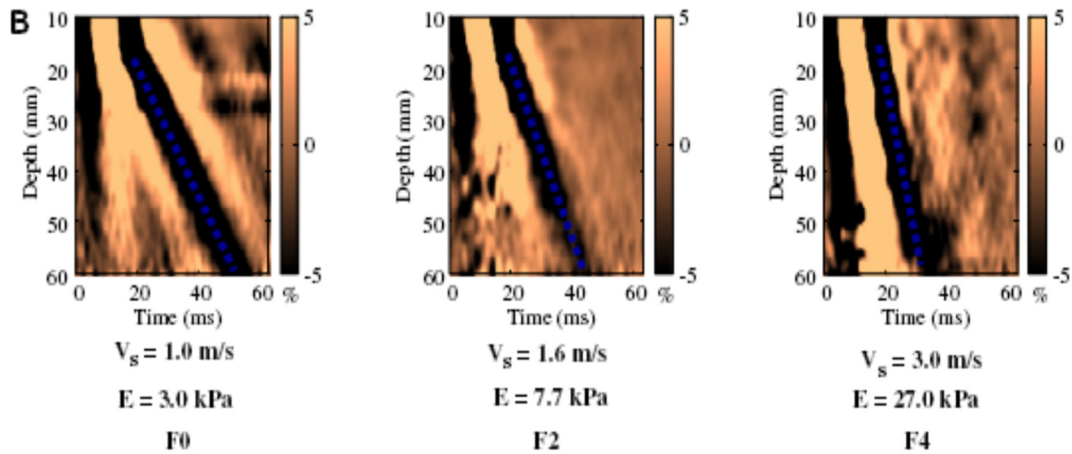


Figura 5: Determinación de la rigidez hepática con el Fibroscan®. Este sistema se compone de una sonda emisora y receptora de la onda mecánica y de ultrasonidos, así como por un ordenador. La sonda contiene un mecanismo vibrador y un transductor de ultrasonidos. La onda mecánica se propaga dentro del hígado y evalúa un volumen de parénquima 100 veces superior al de la biopsia.

Modificación de Castera L, "Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography". J Hepatol. 2008.

Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones tales como: la penetración del pulso mecánico-ultrasónico puede estar disminuida o ausente en pacientes con espacios intercostales estrechos y en pacientes con obesidad muy severa o con ascitis incluso a pesar de la nueva sonda XL diseñada para obviar en parte estos problemas (19). Además, la ET puede verse influida (especialmente en pacientes sin o con escasa fibrosis) por cualquier proceso que modifique la consistencia del hígado. De hecho, pueden observarse valores elevados del Fibroscan® en pacientes con congestión venosa por fallo cardíaco, hipertensión biliar secundaria a colestasis extrahepática y en pacientes con hepatitis aguda o crónica con elevada inflamación (20).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

El Fibroscan® muestra una elevada fiabilidad para identificar precozmente a pacientes con fibrosis avanzada ($F \geq 3$) o cirrosis (F4). Sin embargo, los valores óptimos para diagnosticar cirrosis pueden variar según la etiología de la enfermedad hepática: existen estudios (21) que demuestran un elevado poder diagnóstico para identificar cirrosis hepática en pacientes infectados por el VHC.

Otra de las aplicaciones potenciales de la ET es identificar, de forma precoz y no invasiva, a aquellos pacientes con elevado riesgo de desarrollo de descompensación clínica y varices esofágicas debido a su peor pronóstico. Aunque el método por excelencia para medir la presión portal es la determinación del gradiente de presión portal, se ha descrito una excelente correlación entre la rigidez hepática y este gradiente en estudios realizados con pacientes cirróticos (22).

En consecuencia, la fiabilidad diagnóstica de esta técnica es elevada, pero los valores de referencia pueden variar según las características del paciente, la etiología de la enfermedad y la presencia de factores que modifiquen la consistencia del hígado (23).

6. COMPLICACIONES DE LA CIRROSIS

Las complicaciones que definen la cirrosis descompensada son (Figura 6) (24):

- *Ascitis*: acúmulo de líquido libre intraabdominal con características de trasudado (filtrado de plasma con bajo contenido en proteínas). Este trasudado además puede infectarse (peritonitis bacteriana espontánea), habitualmente a causa de

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

la traslocación bacteriana. Es la complicación más común y más temprana de la cirrosis.

- *Síndrome hepatorenal*: insuficiencia renal funcional y reversible sin que exista alteración de la estructura renal. Se produce debido a una intensa vasoconstricción renal que conduce a una insuficiencia que se establece en el plazo de días o semanas. Suele aparecer de forma muy agresiva y tiene un pronóstico fatal a corto plazo, en la mayoría de los casos en semanas (síndrome hepatorenal tipo I) o de forma más insidiosa, con un pronóstico ligeramente mejor y una supervivencia media de alrededor de seis meses (síndrome hepatorenal tipo II).
- *Encefalopatía hepática*: síndrome neuropsiquiátrico secundario producido por el deterioro de la función neurológica, habitualmente episódico y reversible. Aparece cuando determinados metabolitos, como por ejemplo amonio, pasan directamente de la circulación portal a la circulación sistémica, y acaban afectando al sistema nervioso.
- *Hemorragia digestiva por varices gastroesofágicas*: dilataciones de las venas gástricas y del esófago producidas por aumento de la presión en la vena porta, como consecuencia de la cirrosis hepática. Al aumentar la presión dentro de las varices, se rompen produciendo hemorragias.
- *Ictericia*: tinte amarillento de la piel y las mucosas consecuencia del acúmulo de bilirrubina.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Además de las complicaciones descritas, los pacientes con cirrosis tienen un riesgo aumentado de desarrollar hepatocarcinoma (3) cuya aparición ensombrece el pronóstico del paciente.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

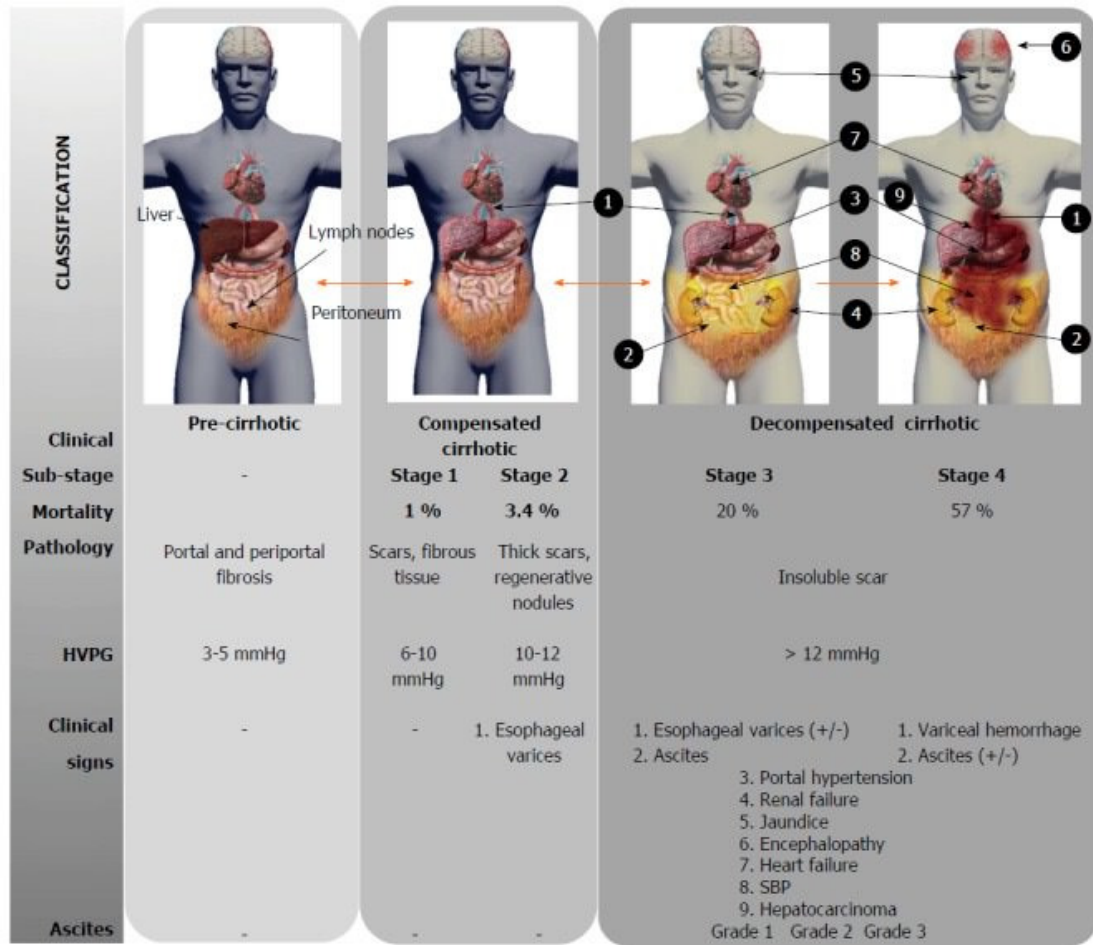


Figura 6: Progresión y complicaciones en la cirrosis. La evolución de la enfermedad cirrótica, de acuerdo a criterios clínicos, ratio de mortalidad, características patológicas, gradiente de presión venosa hepática, signos y presencia de ascitis. El estadio 1 en la cirrosis compensada difiere del estadio 2 en la aparición de varices esofágicas e incremento de la presión portal. El estadio 3 se caracteriza por la presencia de ascitis y/o varices esofágicas. Si tiene lugar una hemorragia por varices, la cirrosis pasa al estadio 4.

SBP: Peritonitis bacteriana espontánea.

Schuppan and Afdhal. Liver Cirrhosis, 2008. Lancet.

7. HEPATOCARCINOMA

El hepatocarcinoma es uno de los tumores de órgano sólido más frecuentes a nivel mundial y la cirrosis es el mayor factor de riesgo para la progresión a HCC (25, 26). Otros factores de riesgo asociados vienen recogidos en la tabla 3. La causa parece estar relacionada con el desarrollo de nódulos regenerativos compuestos de pequeñas células displásicas. La mortalidad en el hepatocarcinoma asociado a cirrosis está en aumento en muchos países desarrollados, mientras que la mortalidad cuando la cirrosis no va asociada a proceso tumoral se encuentra en descenso (27).

FACTORES DE RIESGO PARA CARCINOMA HEPATOCELULAR
Cirrosis
Cirrosis descompensada
Virus de la hepatitis B y C
Enfermedad por hígado graso no alcohólico
Diabetes tipo 2
Exposición a aflatoxinas
Co-infección con múltiples virus: VHB, VHC y VIH (riesgo entre 2-6 veces superior)
Edad avanzada
Sexo masculino
Historial familiar de hepatocarcinoma
Abuso de alcohol como causa secundaria (riesgo entre 2-4 veces superior) o enfermedad por hígado graso no alcohólico como cofactores

Tabla 3: Factores de riesgo para carcinoma hepatocelular

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

El cribado del hepatocarcinoma es uno de los puntos más importantes a tener en cuenta en pacientes cirróticos. Las guías de enfermedad hepática de la Sociedad Europea (EASL) y Americana (AASLD) recomiendan una prueba de cribado cada 12 meses en este tipo de pacientes mediante técnicas de imagen. La determinación en suero de α -fetoproteína, que es un componente esencial de algunos algoritmos de cribado, no se recomienda debido a su escasa sensibilidad y especificidad (28).

Una vez que el hepatocarcinoma es diagnosticado, existen múltiples opciones de tratamiento que dependerán del tamaño del tumor, número y extensión. En pacientes no cirróticos, la resección quirúrgica es la mejor opción y en la mayoría de casos, es curativa. Sin embargo, en pacientes cirróticos sin reserva funcional hepática suficiente para tolerar una hepatectomía, (además de la posibilidad de tener lesiones microscópicas en satélite) la mejor opción es el trasplante hepático (9).

En la actualidad, la mayoría de los centros de trasplante asumen los criterios de Milan (29) para seleccionar pacientes con cirrosis y hepatocarcinoma como candidatos a la realización de un trasplante establecen que han de cumplirse al menos una de las siguientes condiciones: una lesión menor de 5 cm, hasta 3 lesiones menores de 3 cm, sin invasión vascular y sin manifestaciones extrahepáticas. En los pacientes que no cumplen estos criterios y que no pueden ser sometidos tampoco a resección quirúrgica, se opta por procedimientos como: ablación por radiofrecuencia, quimioembolización y radioterapia (30) o tratamiento farmacológico con Sorafenib. Ensayos randomizados han puesto de manifiesto que la supervivencia a largo plazo mediante el empleo de estas técnicas es escasa.

8. ÍNDICES PRONÓSTICO

La valoración adecuada del pronóstico de vida en pacientes cirróticos tiene gran relevancia clínica, en cuanto nos informa del riesgo de muerte del paciente a corto plazo y contribuye a la toma de decisiones en el manejo de diferentes situaciones, tales como indicación de cirugía, *shunt* portosistémico intrahepático transyugular (TIPS) o trasplante hepático. En los últimos cincuenta años se han desarrollado diversas herramientas clínicas con este propósito. Una de las más conocidas y utilizadas es la escala de Child-Pugh, diseñada en 1964 por Child y Turcotte (31) y posteriormente modificada por Pugh (32) (Tabla 4). Esta escala fue diseñada para evaluar la mortalidad asociada a la cirugía de transección de varices esofágicas, pero con el tiempo su uso se extendió a la evaluación de mortalidad en pacientes cirróticos a 1 año, sin mediar cirugía. Dicha clasificación tiene limitaciones, como la inclusión de dos variables cuya evaluación puede ser subjetiva (grado de ascitis y encefalopatía), por lo que hace ya unos años, investigadores de la Clínica Mayo en Estados Unidos desarrollaron el sistema de puntuación MELD (*model end-stage liver disease*) (33).

	1 Punto	2 Puntos	3 Puntos
Bilirrubina (mg/dl)	<2	2-3	>3
Albúmina (g/dl)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
INR	<1.7	1.7-2.3	>2.3
Ascitis	Ausente	Responde a diuréticos	Ascitis refractaria
Encefalopatía	Ausente	Grado I-II	Grado III-IV

Tabla 4: Puntuación de Child-Pugh y mortalidad asociada. Esta puntuación (5-15 puntos) es el resultado de la suma de la puntuación de cada una de las cinco variables. De esta forma, se determina: Child A: 5-6 puntos; mortalidad 0% a un año y 15% a los dos años; Child B: 7-9 puntos; mortalidad 20% a un año y 40% a los dos años; Child C: 10-15 puntos, mortalidad 55% a un año y 65% a los dos años.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Las características de este índice y su amplio uso en la asignación de órganos para trasplante hepático han determinado que sea considerada actualmente la mejor herramienta para estimar el pronóstico a corto plazo de pacientes con cirrosis (34, 35).

Este sistema se basa en tres variables objetivas: *bilirrubina (mg/dl)*, *creatinina (mg/dl)* y *tiempo de protrombina (INR)*:

$$\text{MELD} = 3.78 [\text{Ln bilirrubina (mg/dL)}] + 11.2 [\text{Ln INR}] + 9.57 [\text{Ln creatinina (mg/dL)}] + 6.43$$

El índice MELD fue levemente modificado por la UNOS (*United Network for Organ Sharing*) para ser introducido oficialmente en el año 2002 como método oficial de priorización de pacientes en lista de espera para trasplante hepático con donante cadavérico en Estados Unidos (36). De esta forma, se estableció una política de asignación de órganos basada en la gravedad del paciente y no en la antigüedad a la espera de órgano. Este índice se aplica hoy en día en la mayoría de las unidades de trasplante hepático para priorizar a los pacientes en lista de espera (Tabla 5).

Índice MELD	Mortalidad a los tres meses (%)
<9	1.9
10-19	6
20-29	19
30-39	52.3
>40	71.3

Tabla 5: Índice MELD y mortalidad en la cirrosis. MELD score = 9.57 Ln (creat, mg/dl) + 3.78 Ln (Bil, mg/dl) + 11.2 Ln (INR) + 6.43. Datos tomados de *Wiesmar R et al* (15).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

El índice MELD ha sido validado en diversas publicaciones de pacientes cirróticos de diversas etiologías y con diferente grado de gravedad. Todos los estudios han demostrado que este índice es reproducible y con una excelente capacidad predictiva de mortalidad en pacientes cirróticos ambulatorios y hospitalizados, tanto a los tres meses como al año. Una excepción a la priorización por puntuación MELD la constituyen los pacientes que presentan un hepatocarcinoma con indicación de trasplante hepático (37).

8. ALTERACIONES INTRAHEPÁTICAS

Inflamación

La inflamación es un proceso clave en la progresión de diversas enfermedades como el cáncer, el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal o las enfermedades hepáticas crónicas, y tiene como finalidad la reparación de la lesión tisular eliminando las células y tejidos necróticos (38). El proceso inflamatorio en el hígado es dinámico y si no se resuelve adecuadamente se cronifica en el tiempo y se acaba llegando al estado de fibrosis. El primer paso es la activación de los hepatocitos cuando éstos son dañados por metabolitos tóxicos. Los hepatocitos activados liberan citoquinas que, junto con las propias moléculas causantes del daño, inducen la activación del resto de células hepáticas y el reclutamiento de leucocitos del torrente sanguíneo (39).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Hay un incremento en la expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1, y el reclutamiento se realiza gracias a la interacción entre las moléculas de adhesión existentes en la superficie de las células inflamatorias y de las células endoteliales hepáticas. La composición de este infiltrado inflamatorio incluye monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, células NK y mastocitos. La primera función del infiltrado es eliminar el daño hepático provocando la muerte de los hepatocitos no viables (40).

Los leucocitos, junto con las células inflamatorias residentes en el hígado (células de Kupffer), inician la respuesta inflamatoria en el tejido y empiezan a producir moléculas que alteran el funcionamiento del resto de células hepáticas. Se producen grandes cantidades de óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α , TGF- β , IL-1 o IL-6, que ejercen un efecto directo en la activación de las células estrelladas y en la síntesis de colágeno.

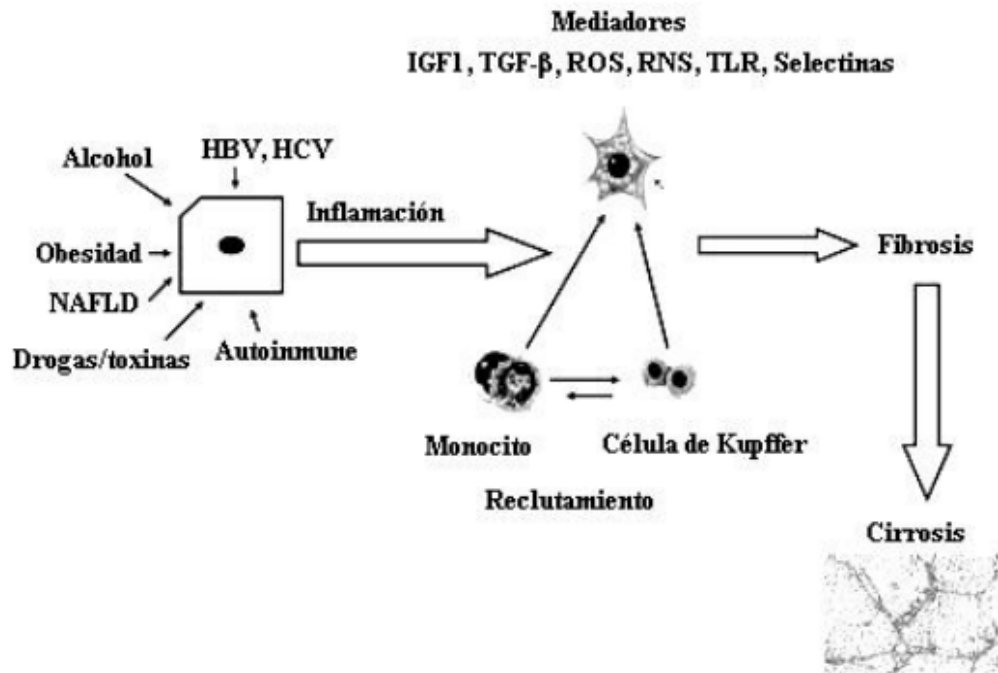


Figura 7: Respuesta inflamatoria tras el daño hepático

Modificación de DasaraThi S, "Inflammation and liver". JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2008.

Fibrosis

La fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular en respuesta a un daño hepático crónico y está precedida siempre por una fase inflamatoria. Este proceso genera cambios en la formación, composición y degradación de la matriz extracelular en el hígado. Si el daño perdura y se vuelve crónico, el proceso de degradación de matriz extracelular no puede contrarrestar al de síntesis. Como consecuencia de esto, el exceso de matriz extracelular que se acumula en la zona perisinusoidal impide la correcta difusión de oxígeno y nutrientes (Figura 8).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

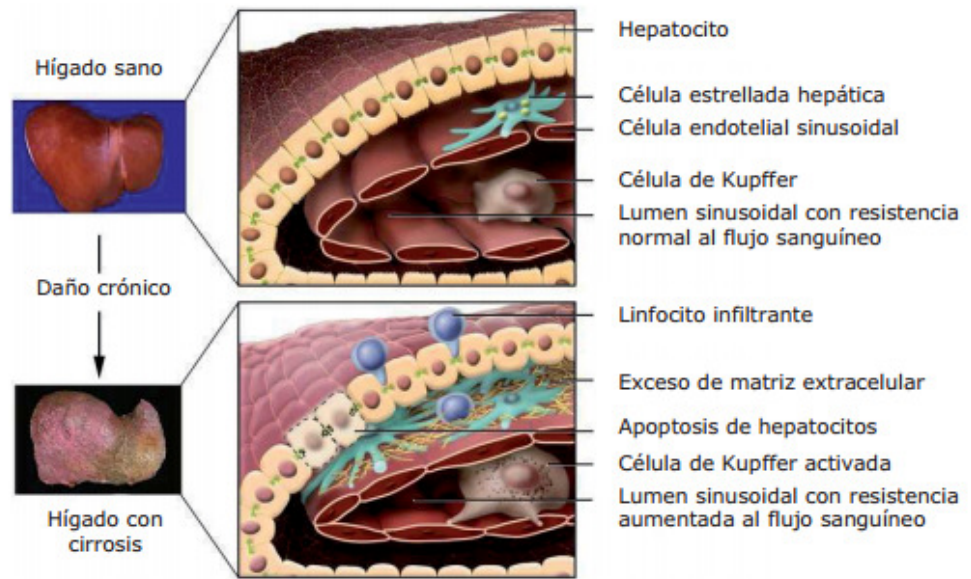


Figura 8: Cambios fenotípicos que tienen lugar en el sinusoide hepático durante la fibrosis.
Figura adaptada de Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. JouARNml of Clinical Investigation. 2005.

Durante el proceso de fibrosis, existe una alteración compleja entre todos los tipos celulares hepáticos. Los hepatocitos son la primera diana de los agentes hepatotóxicos, una vez dañados liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores fibrogénicos e inducen el reclutamiento de más infiltrado inflamatorio. De todas las citoquinas y factores de crecimiento producidos durante el proceso inflamatorio, IL-6, TGF- β y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) son las principales citoquinas profibrogénicas (Tabla 6) (40). El estadio de cirrosis propiamente dicho tiene lugar cuando la estructura del parénquima hepático queda totalmente alterada y el hígado deja de llevar a cabo sus funciones.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

AGENTES ANTIFIBRÓTICOS (CON POTENCIAL APLICACIÓN TERAPÉUTICA)
<u>Inhibidores de la activación de las Células Hepáticas Estrelladas</u>
Citoquinas/Antagonistas de citoquinas
Interferon- $\alpha/\beta/\gamma$
Antagonistas TGF β : oligonucleótidos antisentido de TGF β ; inhibidores de la activación de TGF- β : anti-Integrina $\alpha v\beta 6$ (EMD409849)
Inhibidores de la fosfodiesterasa
Pentoxifilina, inhibidores de fosfodiesterasas 3 y 4 (Rolipram)
Inductores de metaloproteinasas (MMP)
Halofuginona
Prostanoides
Prostaglandina E2
Moduladores vasoactivos
Antagonistas de receptores A de endotelina (LU135252)
Inhibidores del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (Captopril, Enalapril, Pirindopril, Losartán, Irbesartán)
Donadores de óxido nitroso (NO)
Inhibidores de desacetilasas de histonas
Tricostatina A, MS-275
Agonistas de receptores activadores de peroxisomas (PPAR-α)
Glitazonas: Pioglitazona, Rosiglitazona, Troglitazona
Compuestos obtenidos de plantas, principalmente antioxidantes
Apigenina, Componente 861, FuZhengHuaYu, Glicirricina, Inchin-ko-to (TJ-135), Quercetina
Resveratrol, Rooibos, Salvia miltiorriza, Sho-saiko-to (TJ-9), Silimarina
Agonistas de receptores farnesoides X
Ácido 6-etil-quenodeoxicólico
<u>Inhibición de la migración/proliferación de las Células Hepáticas Estrelladas</u>
Inhibidores de la HMG-CoA reductasa

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Estatinas
Diuréticos
Aldosterona (Espirinolactona); Intercambiadores Na ⁺ /H ⁺ (Cariporida)
Inmunosupresores
Micofenolato mofetilo, Rapamicina
Inhibidores de la angiogénesis
Antagonistas del receptor VEGF 1 y 2 (PTK 787)
Anti-Integrina $\alpha\beta$ 3 (EMD409915)
Otros inhibidores de quinasas
Anti receptor de quinasasPDGF- β : Imatinib, SU9518
Hepatoprotectores
Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)
Factor I de crecimiento tipo insulina (IGF I)

Tabla 6: Agentes antifibróticos con potencial aplicación terapéutica

9. TIPOS CELULARES IMPLICADOS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA CIRROSIS

El hígado se compone de células parenquimales, hepatocitos y células no parenquimales (Figura 9). Mientras que los hepatocitos ocupan casi el 80% del volumen total del hígado y realizan la mayor parte de sus funciones, las células no parenquimales constituyen sólo un 20% al volumen total del hígado (39, 41). Casi la mitad de esas células se localizan en el sinusoides hepático. Los sinusoides hepáticos están formados por tres tipos celulares: células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y células

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

hepáticas estrelladas. Ambos tipos de células (parenquimales y no parenquimales) participan en el inicio y progresión de la fibrosis.

Células hepáticas estrelladas (HSCs)

Son también conocidas como células almacenadoras de grasa, células Ito, lipocitos, células perisinusoidales o células ricas en vitamina A. Están ubicadas en el espacio de Disse. En el hígado sano, las células hepáticas estrelladas almacenan vitamina A, controlan la degradación y formación de matriz extracelular y regulan la contractilidad del sinusoides (42). La exposición mantenida a ciertas citoquinas proinflamatorias como el Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (TGF)- β , Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α , e Interleuquina (IL)-1, activa a estas células, pasando de un estado quiescente a un estado activado. Su activación representa un punto clave en el inicio y progresión de la cirrosis y contribuye en gran medida a la deposición de colágeno (43). Dicha activación se caracteriza por fenómenos de migración y proliferación celular, transformación en miofibroblastos, generación de gran cantidad de colágeno y depósito de matriz extracelular.

Estos nuevos miofibroblastos constituyen una nueva fuente de múltiples tipos de proteínas colágenas y no colágenas de la matriz extracelular, como el colágeno tipo I, tipo III, tipo IV, laminina, elastina, fibronectina y diversos proteoglicanos como el condroitínsulfato, dermatansulfato y heparansulfato. Además, la velocidad de proliferación de las células estrelladas hepáticas se incrementa después de su activación, amplificando así el número de células fibrogénicas presentes en el hígado (44).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

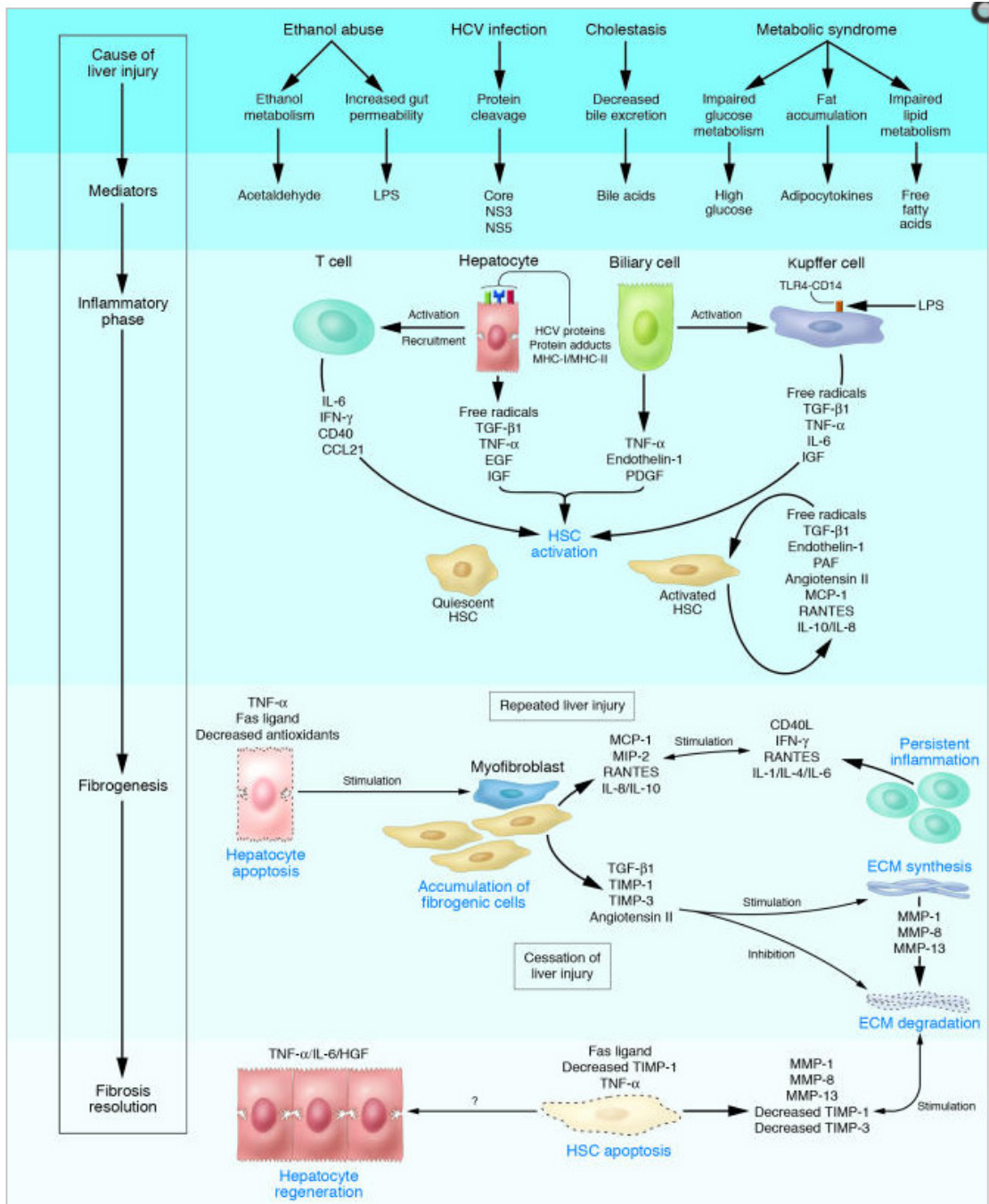


Figura 9: Tipos celulares hepáticos.

Figura adaptada de Friedman SL et al "Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and Therapeutic implications" *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatology* 2004.

Células endoteliales sinusoidales

Forman la pared del sinusoides hepático, también denominado endotelio o revestimiento endotelial. Participan en el intercambio de fluidos, solutos y partículas entre los capilares sinusoidales y las células del parénquima. Además, son células activas en cuanto a la secreción de citoquinas, eicosanoides, sustancias vasoactivas como endotelina-1 u óxido nítrico y algunos componentes de la matriz extracelular (45). Poseen, además, capacidad endocítica. En el hígado cirrótico tiene lugar un proceso de “defenestración” del epitelio sinusoidal y sustitución por una membrana basal subendotelial.

Células kupffer

Las células Kupffer son macrófagos especializados localizados en los bordes de los sinusoides hepáticos y que forman parte del sistema reticuloendotelial (46). Tienen capacidad endocítica y fagocítica, y producen potentes mediadores de la respuesta inflamatoria (especies reactivas de oxígeno, eicosanoides, óxido nítrico, monóxido de carbono, TNF-alfa y otras citoquinas), por ello controlan las primeras fases de la inflamación hepática. Estudios en animales muestran que estas células están implicadas en varias enfermedades hepáticas (47). Las células Kupffer se activan por estímulos como infecciones virales, alcohol, dieta rica en grasa y acúmulo de hierro. Su activación da lugar a la destrucción de los hepatocitos a través de la producción de ciertos mediadores solubles. Participan, además, como células presentadoras de antígeno en

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

las infecciones virales. Las células Kupffer están igualmente implicadas en la activación de las células hepáticas estrelladas. Estudios *in vitro* muestran como esta activación tiene lugar a través de la expresión del receptor PDGF receptor en las HSCs (48, 49, 50).

Hepatocitos

Los hepatocitos constituyen las células parenquimales hepáticas primarias y desempeñan un papel complejo en la fibrosis y cirrosis. Son diana de diversos agentes hepatotóxicos (virus, metabolitos del etanol y ácidos biliares) (51). Los hepatocitos liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores fibrogénicos, los cuáles a su vez activan a las HSCs y promueven acciones fibrogénicas por parte de los miofibroblastos. La apoptosis de los hepatocitos es un fenómeno común en el hígado dañado y contribuye a la inflamación tisular, fibrogénesis y desarrollo de cirrosis.

10. PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN LA FIBROSIS Y LA CIRROSIS

Su denominación se debe a que inicialmente fueron descritas como un tipo de sustancias expresadas en leucocitos, aunque más tarde se vio que se expresaban en una gran variedad de células, tales como linfocitos CD4, monocitos, macrófagos y células endoteliales. Desempeñan diversas funciones en la respuesta inmune, inflamación y fibrogénesis hepática.

En la cirrosis participan regulando la activación de las células hepáticas estrelladas y la fibrogénesis.

PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas)

De todos los factores de crecimiento tipo polipéptido, PDGF es uno de los activadores más potentes de HSCs que existen. PDGF y sus receptores están sobreexpresados en tejidos fibróticos y su actividad se incrementa a medida que lo hace el grado de fibrosis (49). Cuando el PDGF se une a su receptor en la membrana de las HSCs, genera una cascada de señalización molecular que conduce finalmente a la activación de éstas últimas. A su vez, PDGF incrementa la expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-1 e inhibe la actividad de la colagenasa, reduciendo por tanto la degradación de matriz extracelular. Es la activación celular la que induce la expresión del receptor de PDGF en las HSC, ya que en estado quiescente no presentan receptores para este factor de crecimiento (50).

TGF- β (Factor de Crecimiento Transformante tipo β)

Es el inductor de fibrogénesis conocido más potente (52). Es sintetizado por HSCs (a las que también activa), miofibroblastos, células Kupffer, células endoteliales sinusoidales hepáticas y hepatocitos. Existen hasta seis subtipos diferentes de TGF- β , y de ellos, TGF- β 1 es el que desempeña un papel más importante en la aparición de fibrosis (53). Sus niveles de expresión se incrementan y alcanzan un máximo durante la cirrosis, fomentando, entre otros fenómenos, la transcripción de genes de colágeno.

TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral tipo α)

TNF- α es producido fundamentalmente por monocitos, macrófagos, HSCs, y células Kupffer, en las que ejerce su actividad proinflamatoria y citotóxica. Actúa igualmente como activador de HSCs y de la síntesis de matriz extracelular (54).

Interferón

El Interferón (IFN) forma parte de una serie de moléculas solubles extracelulares. Los leucocitos sintetizan IFN- α e IFN- β en respuesta a infecciones virales mientras que las células T secretan IFN- γ tras la estimulación de diversos antígenos y mitógenos. Los diferentes tipos de IFN poseen propiedades antivirales reconocidas: los pacientes tratados con IFN experimentan una reversión de la fibrosis incluso aunque el virus no haya sido totalmente erradicado, indicando que por sí mismo presenta actividad antifibrótica a través de la activación de la apoptosis de las HSCs (55). Estudios realizados en ratas tratadas con IFN- γ ponen de manifiesto una reducción en la producción y deposición de colágeno, laminina, fibronectina y procolágeno tipo I. Sin embargo, el efecto de los diferentes tipos de IFN en la fibrosis es contradictorio: IFN- α mostraría efecto anti-apoptótico en HSCs, mientras que el IFN- γ sería proapoptótico (56).

Interleuquinas pro-fibrogénicas

Las células Kupffer y las células endoteliales sinusoidales hepáticas son capaces de producir de modo precoz IL-1 en respuesta a una agresión sobre el parénquima hepático. Esta interleuquina activa a las HSCs y éstas a su vez comenzarán a producir MMP-9, MMP-13 y TIMP-1, contribuyendo a la aparición de fibrogénesis (57).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Otra citoquina profibrótica es la IL-17, cuyos niveles de expresión se incrementan a medida que lo hace el grado de fibrosis indicando que esta citoquina puede desempeñar un papel en la progresión de la enfermedad y cronicidad (58, 59).

Características y funciones biológicas de la Interleuquina 17

La interleuquina 17A (IL-17A) también denominada IL-17 es una glicoproteína homodimérica de 155 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 35 kDa. Fue descubierta en 1993 (60) y pertenece a una familia de citoquinas que incluyen a IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también llamada IL-25) e IL-17F. IL-17A e IL-17F presentan gran homología entre sí. IL-17 es producida principalmente por una subclase de células T denominada TH17. El Factor de Crecimiento Transformante tipo β (TGF- β), la IL-1 y la IL-6 estimulan la producción de IL-17 por parte de estas células, mientras que la IL-23 es necesaria en la expansión y estabilización celular. Al mismo tiempo, citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la Interleuquina 1 β estimulan la producción de ésta por parte de las células Th17 (59).

La IL-17A es producida por neutrófilos, macrófagos y células NK. Esta citoquina está implicada en la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) el asma o la artritis reumatoide (60). Juega un papel esencial en la defensa del huésped contra bacterias extracelulares y hongos y media en el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos en tejidos no linfoides.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Interleuquinas antifibrogénicas: La IL-10 es una citoquina que inhibe la respuesta proinflamatoria y tiene efecto modulador en la fibrogénesis hepática (61, 62). Otras, como la IL-22 y la IL-6 desempeñan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune, inflamación y reparación tisular.

En definitiva, se crea un círculo de retroalimentación en el que las células inflamatorias del sistema inmune estimulan el componente fibrogénico, al tiempo que la fibrosis actúa sobre la subpoblación de linfocitos Th. La cirrosis una vez establecida, es un proceso dinámico en el que el sistema inmune se encuentra sometido a una estimulación anormal que puede predisponer a infecciones bacterianas, alteraciones hemodinámicas y respuesta inflamatoria por parte de otros órganos.

11. TRATAMIENTO DE LA CIRROSIS

Recientes hallazgos del proceso de fibrogénesis hepática ponen de manifiesto que se trata de un proceso dinámico y reversible. Estudios en animales y clínicos muestran cómo cierto grado de fibrosis e incluso de cirrosis puede ser revertido con determinadas estrategias terapéuticas (63):

Terapias basadas en el tratamiento etiológico

Tratar la causa que originó la cirrosis es la opción más directa y efectiva. De hecho, los tratamientos frente al VHB y VHC, la abstinencia de alcohol, control del peso

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

y la ingesta de grasas, tratamiento de las sobrecargas de hierro y cobre se consideran terapias potencialmente efectivas en un elevado porcentaje de casos de cirrosis.

Antiinflamatorios e inmunosupresores

La inflamación intrahepática y la respuesta inmune son causas de daño directo en los hepatocitos y dan lugar a la activación de las HSCs. De ahí que se haya planteado el uso de antiinflamatorios e inmunosupresores para inhibir el proceso de fibrogénesis, especialmente cuando la fibrosis/cirrosis es el resultado de hepatitis, autoinmune o colangitis esclerosante primaria. Antiinflamatorios como el Celecoxib y antioxidantes como la Taurina y la Vitamina E muestran cierto grado de efecto antifibrótico (64). De igual modo, los glucocorticoides, la Azatioprina, Colchicina y Rapamicina muestran propiedades antiinflamatorias, antifibróticas e inmunomoduladoras, y son potencialmente útiles en el tratamiento de la cirrosis autoinmune.

Actividad inmunosupresora y apoptosis en HSCs

Las células hepáticas estrelladas desempeñan un papel esencial en la fibrogénesis hepática, por tanto, son potenciales dianas terapéuticas de terapia antifibrótica: se puede fomentar su inhibición inhibiendo las rutas TGF- β 1 (Factor de crecimiento de fibroblastos) y PDGF- β . Diversas citoquinas y factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento tipo Insulina tipo 1 o los Interferones α y γ (IFN- α , IFN- γ) han demostrado ser capaces de inducir apoptosis en este tipo de células, del mismo modo que los inhibidores de quinasas (65). Otras sustancias con capacidad para inducir apoptosis en HSCs son gliotoxina, sulfasalazina, ligandos tipo benzodiazepina, etc.

Función protectora y regeneración hepática

Hasta ahora se han venido utilizando ciertas sustancias como coadyuvantes en el tratamiento de la cirrosis hepática, fundamentalmente por su función hepatoprotectora, como es el caso de la Silimarina, con propiedades antioxidantes y capacidad para fomentar el crecimiento de células hepáticas por medio de la síntesis de proteínas (65). El ácido ursodesoxicólico y tauroursodesoxicólico presentan asimismo efecto hepatoprotector y, de hecho, son utilizados en el tratamiento de la Colangitis Biliar Primaria y Colangitis Esclerosante Primaria. Por otra parte, los antagonistas de calcio (v.g. Verapamilo) a través de un mecanismo de estabilización de la membrana celular y disminución de la presión venosa portal ejercen efectos hepatoprotectores y antifibróticos.

La apoptosis de hepatocitos es un fenómeno común en la enfermedad hepática y contribuye al desarrollo de fibrogenesis y cirrosis. Por tanto, previniendo la apoptosis y promoviendo la regeneración de hepatocitos se puede frenar la progresión de la enfermedad.

Terapia génica y terapia dirigida

Se ha investigado sobre la posibilidad de utilizar diversos genes con funciones esenciales en la patogénesis de la cirrosis como potenciales dianas terapéuticas: TGF- β , PDGF- β , CTGF (Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo), y TIMP (Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas). Se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* con oligonucleótidos antisentido y sondas de ARN frente a estos genes. Recientemente, se ha visto que el

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

existen microARNs que juegan un papel regulador a través de la expresión de genes fibróticos y antifibróticos y actuando sobre la proliferación y activación de HSCs. De ahí, que la terapia basada en su empleo esté siendo contemplada como una opción terapéutica más (67).

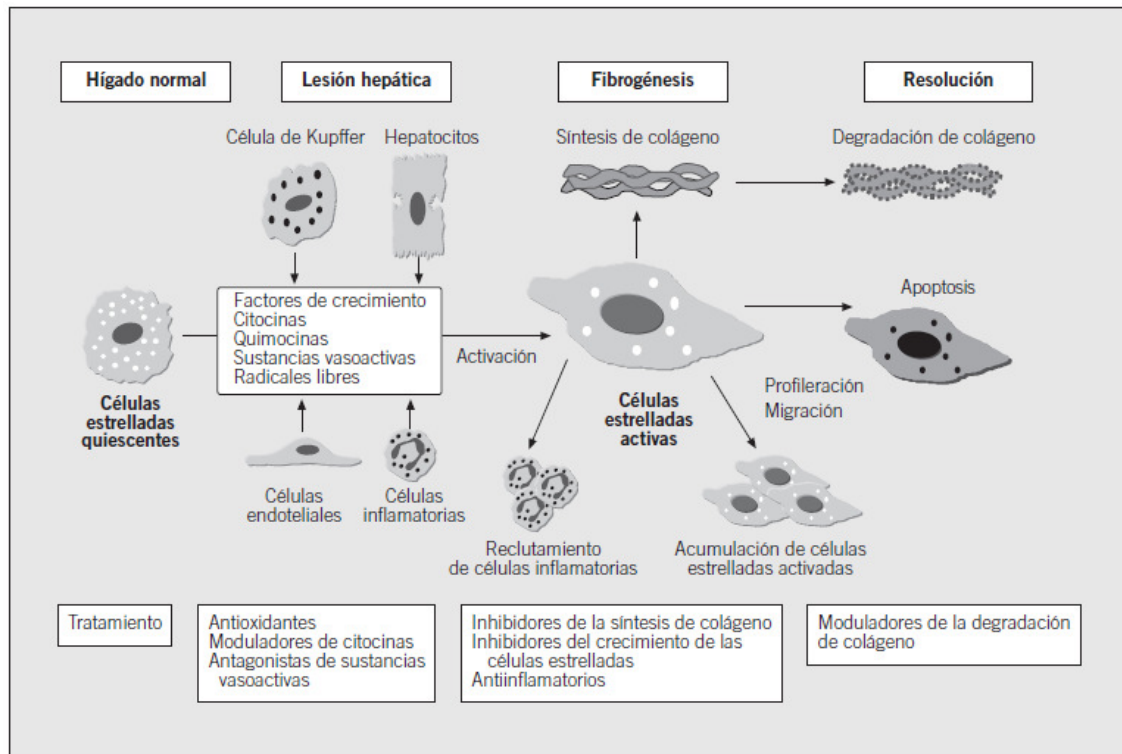


Figura 10: Acciones biológicas de las células estrelladas hepáticas en la fibrosis hepática y mecanismo de acción de los diversos tratamientos antifibróticos. Figura adaptada de Bataller R, et al. "Nuevas perspectivas terapéuticas de la fibrosis hepática: bases patogénicas" *Med Clin (Barc)* 2002.

12. CIRROSIS HEPÁTICA Y EXPRESIÓN GÉNICA

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

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

son dos causas que potencian el desarrollo de cirrosis hepática y de carcinoma hepatocelular. El virus provoca una inflamación del lobulillo 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 (68). 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.

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 (69).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

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) digital. 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.

El análisis de los perfiles de expresión en sangre periférica es una herramienta ampliamente extendida para evaluar las complejas redes que actúan en nuestro organismo. Resulta, por tanto, una aproximación válida en el estudio de la patogénesis y en la identificación de potenciales biomarcadores de una amplia variedad de enfermedades (70). Mientras que existe un amplio número de publicaciones que evalúan los perfiles de expresión génica en tejido hepático de pacientes cirróticos o con enfermedades hepáticas crónicas (71), (72), (73), (74), los estudios de perfiles transcriptómicos en sangre periférica en estos pacientes son muy escasos. El tiempo es un parámetro fundamental en estos casos, 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.

Este estudio pone de manifiesto por primera vez la presencia de programa de respuesta activa profibrótica en sangre periférica en pacientes cirróticos terminales, coexistiendo con alteraciones en el metaboloma. Nuestros hallazgos evidencian el fuerte impacto de la cirrosis en el sistema inmune a nivel sistémico, aportando interesantes claves en el papel de los leucocitos periféricos en la patogénesis de esta enfermedad.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

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

Objetivos

El presente trabajo se realizó mediante un estudio observacional prospectivo. Para poder comprobar la hipótesis de partida se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivos principales:

1. Estudiar los perfiles de expresión génica diferencial en pacientes con cirrosis avanzada respecto a controles sanos.
2. Describir rutas de señalización intracelular alteradas en la cirrosis.

Objetivos secundarios:

1. Describir las características clínicas de los pacientes cirróticos estudiados.
2. Describir las características clínicas diferenciales de los pacientes con/sin hepatocarcinoma y comparar la expresión génica en ambas poblaciones.
3. Describir si el perfil de expresión génica de los pacientes cirróticos predecía la aparición de rechazo agudo en ellos tras recibir un trasplante hepático.

Material y métodos

Material y métodos

1. Diseño del estudio

Estudio prospectivo, observacional en el que se recogieron datos demográficos, clínicos, analíticos y muestras biológicas de treinta pacientes con diagnóstico de cirrosis terminal procedentes de la Unidad de Hepatología del Hospital Universitario Río Hortega, reclutados entre noviembre de 2012 y octubre de 2013.

Se analizaron las características clínicas y demográficas de los pacientes y las huellas transcriptómicas en leucocitos de sangre periférica, comparando éstas últimas con las obtenidas de ocho controles sanos del mismo rango de edad del propio personal del hospital (grupo control). Asimismo, se intentó estudiar nuevamente la huella transcriptómica en leucocitos de sangre periférica de los mismos pacientes el día 7 ± 3 días postrasplante hepático. Todos estos datos han sido integrados con el fin de generar un modelo explicativo de la patogénesis de la cirrosis.

Criterios de inclusión:

Se incluyeron en el análisis todos aquellos pacientes de entre 18 y 65 años, ingresados en la Unidad de Trasplante Hepático con diagnóstico de cirrosis terminal y que iban a ser sometidos a Trasplante Ortotópico de hígado.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Criterios de exclusión:

Se excluyeron del análisis aquellos pacientes que no firmaron el consentimiento informado, así como los menores de 18 años.

Del total de pacientes reclutados en este periodo de tiempo, únicamente 30 cumplieron los criterios de inclusión/exclusión.

En la tabla 7 se detalla la etiología de la cirrosis de todos los pacientes finalmente incluidos en el estudio.

Etiología cirrosis	Pacientes
Enfermedad Alcohólica	17
VHC	3
VHC+Enfermedad alcohólica	5
Otras causas	5

Tabla 7: Etiología de la cirrosis del total de pacientes incluidos en el estudio.

Población control

Se incluyeron 8 controles sanos reclutados entre los trabajadores del Hospital Universitario Rio Hortega, de edad y sexo similar a los pacientes. Ninguno de los voluntarios tenía antecedentes clínicos relevantes ni presentaron signos de infección o estado inflamatorio en el momento de la recogida de la muestra.

Comité de Ética. Consentimiento informado

La aprobación del protocolo del estudio, tanto en los aspectos científicos como éticos, se obtuvo del Comité de Ética e Investigación Clínica CEIC-Área Oeste del Hospital

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Universitario Rio Hortega, conforme a los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975. Además, todos los pacientes firmaron una hoja de consentimiento informado (Anexo 1), a través de la cual aceptaban su participación en el estudio.

Muestras recogidas

Para una correcta recolección y conservación de las muestras se estableció un protocolo de recogida, codificación, etiquetado y almacenamiento común (Anexo 2). Una vez que las muestras de los 30 pacientes fueron recolectadas se enviaron al laboratorio de Investigación Médica en Infección e Inmunidad del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (IECSCYL).

A todos los pacientes en el momento de su ingreso y previo a la realización del trasplante de hígado se les tomó una muestra de sangre en tubo de EDTA (Ácido etilendiamino tetra acético) para la realización de un hemograma, un tubo sin anticoagulante con gel de 5 a 10 ml para un perfil de bioquímica y un tubo con anticoagulante citrato para una coagulación.

Además de las muestras anteriormente mencionadas, se recogieron 2,5 mililitros de sangre en un tubo especial PAXgene para el análisis de perfiles de expresión génica. Los tubos PAXgene contienen un aditivo que estabiliza el perfil de transcripción génica in vivo reduciendo la degradación del ARN in vitro y eliminando la inducción de la expresión génica (75). En el caso de los controles sanos, únicamente se recogieron muestras en tubos PAXgene.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

A todos los pacientes el día 7±3 postrasplante hepático se les extrajo un nuevo tubo PAXgene para el análisis de perfiles de expresión génica.

Conservación de las muestras

El tubo PAXgene se mantuvo en posición vertical a temperatura ambiente un tiempo mínimo de 2 horas antes de su congelación para asegurar la lisis completa de las células. La temperatura de almacenamiento fue de -80°C.

2. Recogida de datos clínicos y otros parámetros de laboratorio

Datos clínicos

Se recogieron detalles demográficos como edad, sexo, etiología de la cirrosis y presencia de comorbilidades. Todos los datos recogidos se detallan en el Anexo 3.

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,

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

por ello nos hemos decantado por la escala MELD, calculada en el momento previo al trasplante.

Parámetros de laboratorio

Se recogieron datos hematimétricos (hemoglobina, leucocitos, neutrófilos y plaquetas), bioquímicos (bilirrubina, GOT, GPT, etc.) y de coagulación en el ingreso previo al trasplante. Estos datos también se detallan en el Anexo 3.

Análisis estadístico de los datos clínicos y bioquímicos

El análisis estadístico de los datos clínicos se llevó a cabo utilizando el programa Microsoft Excel y la versión 20.0 del programa SPSS para Windows. El nivel de significación estadística se fijó en 0,05.

Dentro de nuestra cohorte de pacientes se establecieron dos subgrupos: pacientes con/sin hepatocarcinoma. La población de estudio no presentaba una distribución normal, según el test de Shapiro-Wilk, por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis estadístico de los datos. Las diferencias entre ambos subgrupos a nivel de datos clínicos se evaluaron por medio del empleo del test chi-cuadrado para las variables categóricas y Mann-Whitney para las variables continuas.

Por otra parte, se realizó un análisis similar estratificando en esta ocasión en función de la presencia/ausencia de Rechazo Agudo Leve.

La representación gráfica de las edades de los diferentes grupos de pacientes en cajas (mediana, rango intercuartil) se realizó con el programa SPSS versión 20.0 para

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Windows. El gráfico de representación de la distribución por sexos se llevó a cabo utilizando el programa Microsoft Excel.

3. Perfiles de expresión génica. Transcriptómica.

Protocolo de trabajo

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.

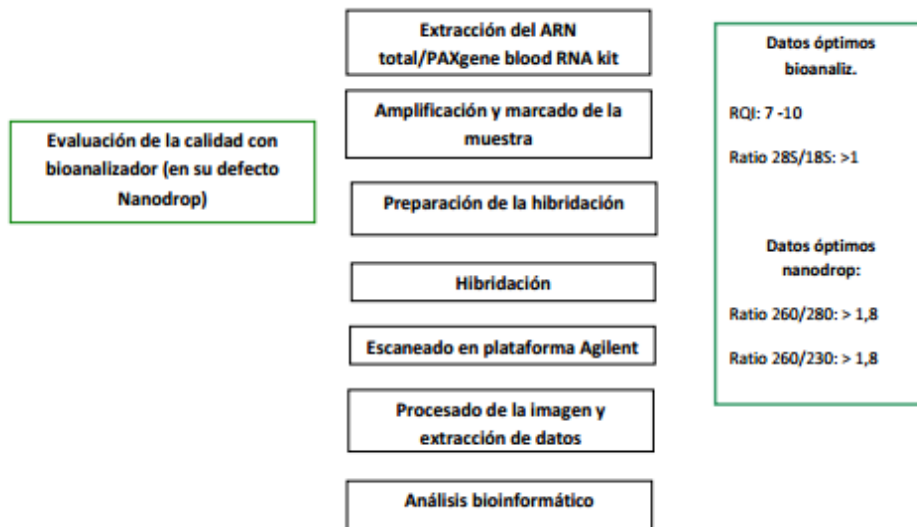


Figura 11: Esquema de trabajo para el análisis de expresión génica.

Los pasos que se siguieron para evaluar la expresión génica diferencial se muestran en la figura 10 y se detallan en las siguientes secciones.

Extracción del ARN total

La extracción de ARN total se realizó a partir de los tubos PAXgene empleando el equipo "PAXgene blood ARN kit" (Becton Dickinson, USA). El sistema proporciona la recogida, almacenamiento y transporte de sangre, así como la estabilización del ARN intracelular a partir de sangre total para su posterior utilización. El fundamento de este kit se basa en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales. En condiciones normales, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua que mantienen su solubilidad en soluciones acuosas. Con la adición de sales a los ácidos nucleicos, se destruye esta ordenada estructura de moléculas de agua de la capa hidratante, por lo que las sales crean un entorno hidrofóbico alrededor de los ácidos nucleicos. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, al pasar los ácidos nucleicos a través de una columna con membrana de sílice, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a ella, mientras que las proteínas, metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS



Figura 12: Kit de extracción de ácidos nucleicos.

Para eliminar el ADN de la muestra y obtener únicamente ARN purificado se añade ADNsa a la muestra, es decir, aproximadamente 1750 ng de ARN de cada muestra se concentraron con el kit RNeasy MinElute Cleanup (QIAGEN, Hilden, Alemania). Posteriormente, el ARN se eluye de la membrana de sílice con 10 μ l de agua libre de AARNmsa que permite recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, produciendo así la liberación del ARN. Con este proceso de purificación, se obtiene ARN altamente purificado y listo para usar en procesos posteriores (figura 13).

Procedimiento

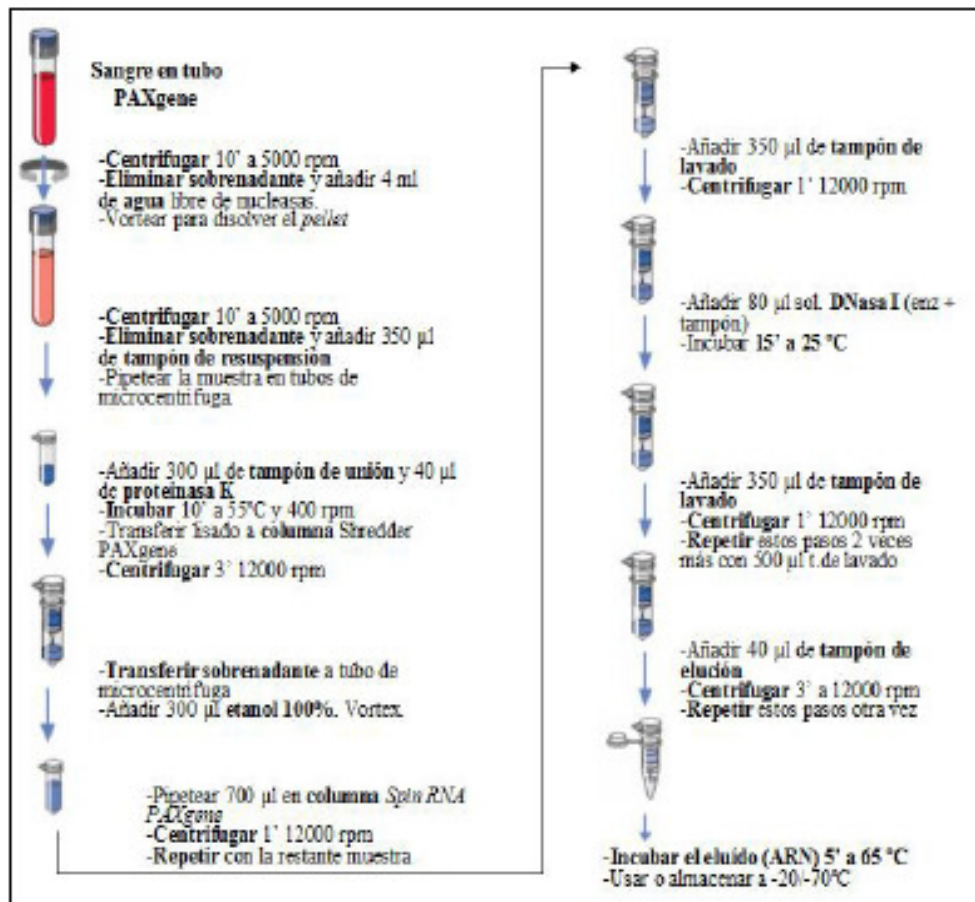


Figura 13: Pasos a seguir para la extracción de ARN con el kit "PAXgene blood ARN kit".

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, que en nuestro caso son 100 ng. 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.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Cuantificación

La cuantificación del ARN se basa, al igual que para ADN, en medidas de absorbancia mediante espectrofotometría, utilizando el rango de luz ultravioleta (UV). El método espectrofotométrico está basado en la medida directa de la absorción de la radiación electromagnética por parte de la muestra, siendo esta cuantificable mediante la correlación de la Absorbancia (OD) con la concentración del ácido nucleico a determinar. En el caso del ARN, 1 OD corresponde aproximadamente 40 µg/ml de ARN. Por tanto, el cálculo de la concentración de una muestra de ARN se estima como:

$$A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Factor de dilución}$$

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. La cuantificación de la cantidad de ARN obtenido tras la purificación, se realizó en el espectrofotómetro de amplio espectro (220-270nm) NANODROP ND1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware USA), a partir de 1µl de muestra.

Mediante el mismo NANODROP, se evaluó la pureza del ARN midiendo la relación existente entre la absorbancia a 260 y a 280. Este valor debe estar comprendido entre 1,8 a 2, lo que indicaría que el ARN está libre de impurezas. Si el valor es menor que 1,8 significaría que el ARN tiene algún contaminante (proteínas, fenol, etano, etc.). Cuando más bajo sea este valor, más contaminada está la muestra.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Evaluación de la calidad

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 calidad del ARN se determinó mediante el bioanalizador Bioanalyzer Experion (Biorad, California USA). Se trata de un sistema de microelectroforesis que emplea nanocapilares. De este modo, se minimiza la cantidad de ARN que se usa para este control.

Mediante el uso del bioanalizador, se obtiene el algoritmo RQI (ARNM Quality Indicator) que permite determinar la calidad de las muestras en base a un rango numérico del 1 al 10, siendo 1 el valor para una muestra de ARN totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta. Además, permite la obtención de imágenes de la microelectroforesis (gel, electroferogramas) para determinar visualmente la integridad del ARN y ausencia de ADN genómico contaminante (no sólo el valor del RIN, si no también concentración y relación 28/18S). Los perfiles de expresión génica se evaluaron, únicamente en aquellas muestras con una pureza e integridad adecuadas.

Atendiendo a todos estos parámetros únicamente se hibridaron 30 de las 38 muestras disponibles de pacientes cirróticos y 8 de las 15 muestras respecto a controles sanos. En los pacientes trasplantados no se consiguió amplificar el ARNm por existir muy poca cantidad de leucocitos, probablemente debido a la leucopenia habitual del postoperatorio secundario a la lesión de preservación.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

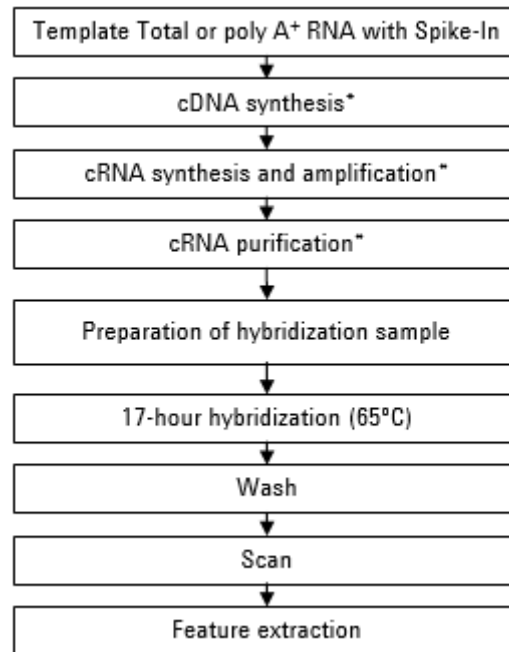


Figura 14: Esquema donde se resumen los pasos de preparación de la muestra y procesamiento de los arrays.

Amplificación y marcaje

Este proceso se llevó a cabo utilizando el kit de marcaje Quick Amp Labelling (Agilent p/n 5190-0442) siguiendo las instrucciones del fabricante: es decir, según el protocolo “One-Colour Microarray Based Gene Expression Analysis” versión 5.7 (Agilent p/n 4140-90040) (76), se hibridaron 3 μ g del ARNc marcado utilizando arrays de expresión génica de transcriptoma humano completo con la tecnología 4x44K v2 de Agilent. El objetivo es obtener ARN complementario (ARNc) partiendo de una cantidad de ARN entre 10 y 200 ng (en torno a 100 ng) marcado con una sustancia fluorescente, en este caso Cianina. El método utiliza ARN polimerasa de T7, que a la vez que amplifica el ARN de partida incorpora Cianina-3 marcada con CTP.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

El primer paso es una retrotranscripción inversa para la síntesis de casi la totalidad de la longitud del ADN complementario (ADNc), lo que asegura la obtención de muestras reproducibles para el análisis de microarrays (Figura 15). Para esta reacción se utilizaron cebadores T7 oligo (dT) que contienen una secuencia oligo (dT) en el extremo 3' para la unión específica a la cadena de ARNm y una secuencia core del promotor T7 en el extremo 5' para que la polimerasa se pueda unir y actuar. De esta manera el ADNc generado portará una secuencia promotora T7.

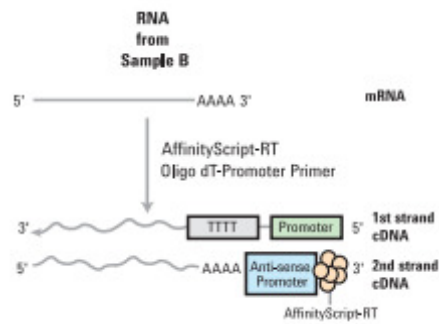


Figura 15: Síntesis de ARNc a partir de ARN total.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

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 ARNsa 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.

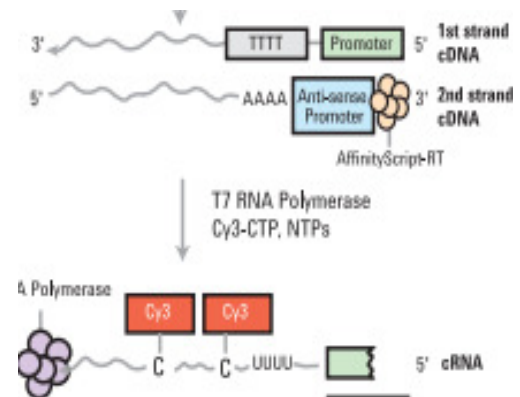


Figura 16: Síntesis de ADNc de doble cadena.

La transcripción in vitro (TIV) de ARNc, gracias a la tecnología Low Input Quick Amp Labeling genera múltiples copias de ARNc-Cy-3 a partir del dsADN, siendo este proceso la reacción de amplificación y marcado real. La ARN polimerasa utilizada es T7 polimerasa cuyo nombre procede del bacteriófago del que fue clonado. La ARN polimerasa T7 es dependiente de un molde ADN y muy específica para el promotor T7. Después de que la ARN polimerasa se une al promotor del ADN de doble hebra, la polimerasa separa las dos hebras y usa la cadena 3'-5' como molde para la síntesis de una cadena de ARN 5'-3' complementaria. Por último, se realiza una purificación de

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

ARNc para eliminar NTPs no incorporados, enzimas y el fosfato inorgánico. Tras la purificación, el ARNc estaría listo para su hibridación en el array.

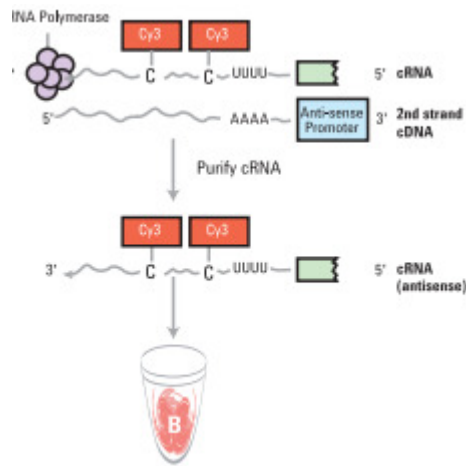


Figura 17: Síntesis de ARNc marcado con Cianina-3

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.

La concentración de una solución ARNc se puede determinar midiendo su absorbancia a 260 nm. El espectrofotómetro NanoDrop 1000A (www.nanodrop.com) es recomendable por su rapidez y facilidad de uso.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Por otra parte, la concentración de ARNc se puede determinar diluyendo una parte de la preparación en TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA), y realizando una lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro tradicional a 260 nm. La concentración se determina en mg / ml multiplicando el A260 por el factor de dilución y el coeficiente de extinción. (1 A260 =40 mg/mL de ARN).

El rendimiento ARNc dependerá de la cantidad y la calidad de poli (A) ARN en el ARN total de entrada. Dado que la proporción de poli (A) ARN en el ARN total se ve afectada por condiciones como la salud del organismo y el órgano de procedencia, el rendimiento del ARNc generado a partir de una misma cantidad de ARN total puede variar considerablemente. En este sentido, se calcula la Actividad Específica (SA), que se define como pg de cianina por µg de ARNc.

La concentración del ARNc obtenido se midió en el espectrofotómetro (UV-visible) Nanodrop ND-1000. Se registraron las medidas de concentración de cARNM (ng/ µl), de cianina 3 y cianina 5 (pmol/ µl) y la ratio de absorbancia 260nm/280nm. Además, se calculó la cantidad de ARNc obtenido en µg, según las fórmulas que se detallan a continuación:

$$\text{Concentración de ARNc} \times 30 \mu\text{l (volumen de elución)} / 1000 = \mu\text{g de ARNc}$$

(Para calcular el rendimiento de ARNc)

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Para determinar la actividad específica, se usaron las concentraciones de ARNc (ng/ μ l) y de cianina 3 o cianina 5 (pmol/ μ l):

$$\text{(Concentración de Cy3 o Cy5) / (Concentración de ARNc) x 1000 = pmol Cy3}$$

por μ g de ARNc.

Todas las muestras que rindieron una concentración menor de 825 ng de ARNc se descartaron, así como las muestras con una actividad específica menor de 8 pmol de cianina por μ g ARNc, tal y como recomienda el fabricante.

Hibridación

El proceso de hibridación se realizó utilizando arrays de expresión génica de transcriptoma humano completo con la tecnología 4x44K v2 de Agilent (76). Cada array de expresión ofrece cobertura de todo el transcriptoma puesto que contiene 44.000 sondas de transcripción diferentes (genes bien caracterizados, genes candidatos, y variantes de “splicing”).

La tecnología de Agilent para el análisis de expresión génica consiste en una serie de oligonucleótidos inmovilizados por enlaces covalentes en microesferas que se localizan en micropocillos en la superficie de la matriz o array. Estas sondas poseen una secuencia de 60bases (60-mer), que es la encargada de hibridar con el ARNc marcado.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

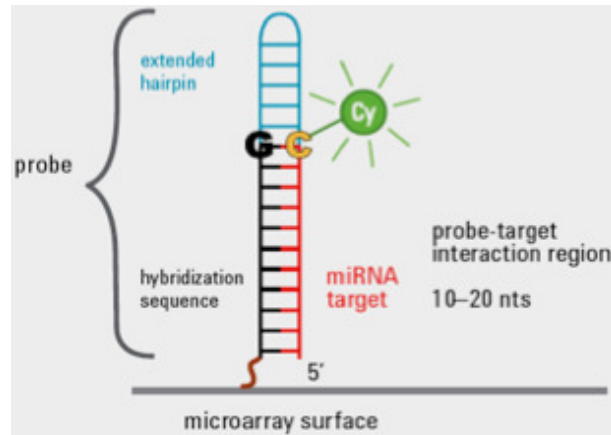


Figura 18: Diseño de las sondas. Tecnología Agilent

La alta calidad y reproducibilidad de este sistema se basa en el gran número de sondas redundantes presentes en el array, hasta 30 por sonda (lo que supondría más de 1,8 millones de microesferas en total). Además, cada microesfera contiene cientos de copias de la sonda por toda su superficie, asegurando más aun la alta sensibilidad, especificidad y precisión de la técnica.

El diseño de las sondas se realiza atendiendo a las secuencias de la base de datos de referencia del NCBI y de UniGene 188, de forma que el contenido de la sonda está muy bien anotado y ampliamente aceptado. En cuanto a la matriz que contiene las sondas, se han utilizado técnicas litográficas estándar para crear pocillos con una distribución en forma de panal en la superficie de unas láminas de vidrio. Cada pocillo va a recoger una esfera. Las esferas se mezclan en cantidades iguales y se depositan en la superficie del array de forma que por desplazamiento ocuparan los pocillos de forma

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

aleatoria. La identidad de esas microesferas vendrá determinada por la secuencia “address” que contenga.

Los chips que se han utilizado en este experimento contienen 4 arrays separados los unos de los otros por un sello, de manera que cada array puede ser hibridado con una muestra diferente.

Protocolo

Solamente se hibridaron los ARNs resultantes del proceso de transcripción *in vitro* y purificación con una calidad e integridad adecuadas. La hibridación se llevó a cabo con los tampones adecuados durante 30 minutos a 60°C (para fragmentar el ARN) y posteriormente 17 horas a 65 °C (proceso de incubación). Tras la hibridación, los arrays se lavaron para proceder finalmente al escaneado. El proceso de lavado se realizó en un ambiente con niveles de ozono por debajo de 50 ppb (Figura 19):

	Dish	Wash Buffer	Temperature	Time
Disassembly	1	GE Wash Buffer 1	Room temperature	
1st wash	2	GE Wash Buffer 1	Room temperature	1 minute
2nd wash	3	GE Wash Buffer 2	Elevated temperature	1 minute

Figura 19: Condiciones de lavado

Procesado de la imagen y extracción de los datos

El escaneado se realizó con la plataforma de Agilent y los datos fueron extraídos por medio del software versión 9.5.3 proporcionado por el mismo fabricante. Se trata de un sistema compacto de alto rendimiento de escáner para obtener imágenes de microarrays. Las microesferas son iluminadas por un haz de luz de fibra óptica que excita los compuestos fluorescentes. La emisión de fluorescencia de Cy3 se detecta cuantitativamente para el análisis posterior (Figura 20).

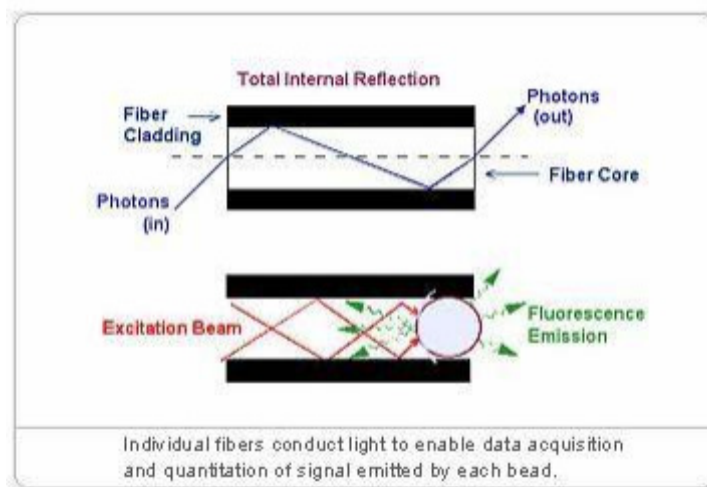


Figura 20: Fundamento de excitación, emisión y captura de la plataforma de escaneado de Agilent.

El software utilizado para la adquisición y extracción de los datos fue el Agilent C Scanner. Una vez obtenidos los archivos de imágenes, utilizando dicho software, se transformaron las intensidades de las señales obtenidas en datos numéricos:

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

For 1x244K, 2x105K, 4x44K and 8x15K HD Microarray Formats	
Dye channel	Green
Scan region	Scan Area (61 x 21.6 mm)
Scan resolution (µm)	5
Tiff	20 bit

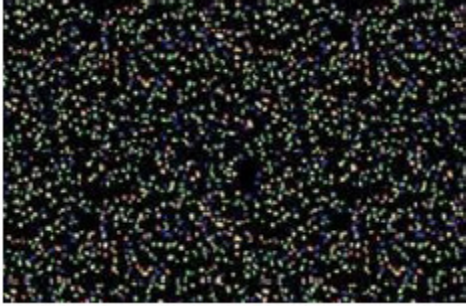


Figura 21: Características del escaneado de los slides e imagen obtenida tras el escaneado de los microarrays.

Los datos se analizan mediante un algoritmo patentado por Agilent que permite seleccionar la mejor sonda para cada gen en base a su capacidad de respuesta y especificidad. Se generó una base de datos con los valores de intensidad de cada una de las sondas que codifican para un gen determinado sobre la que se realizó el análisis bioinformático. Mediante dicho software también se realizó un control de calidad para evaluar la existencia de posibles errores que tuvieron lugar durante el proceso de hibridación.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

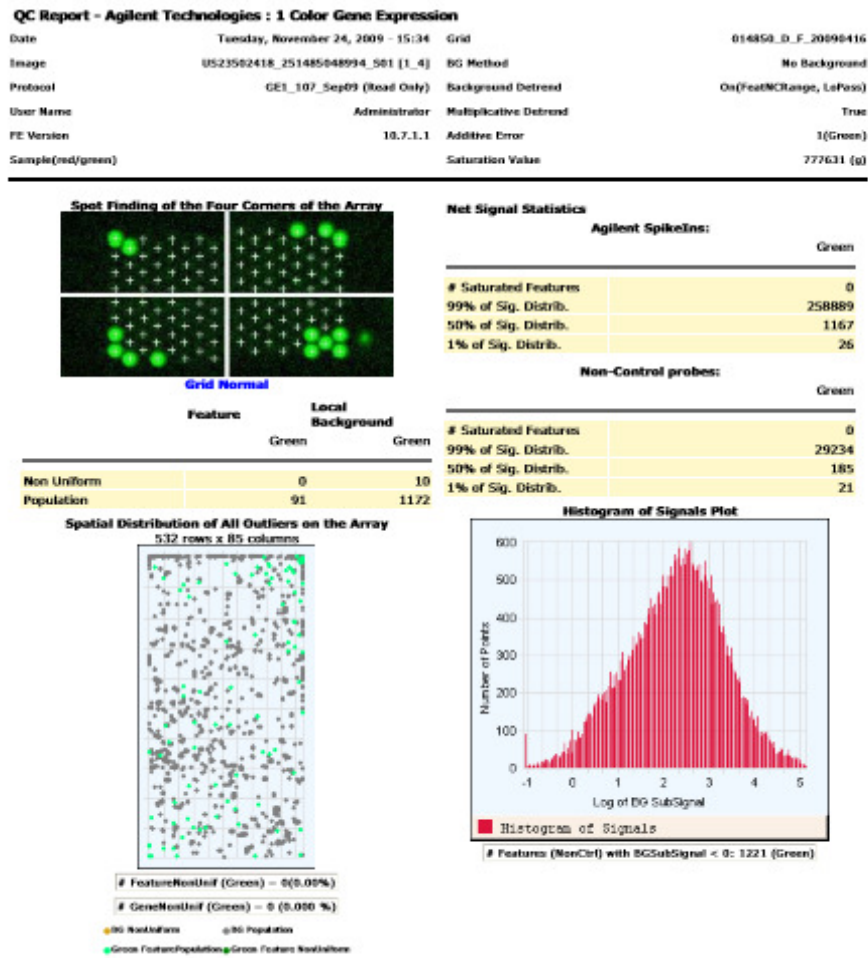


Figura 22: Informe del Control de Calidad para microarrays 4x44K, generado por dicho software.

Análisis bioinformático

El análisis de los datos obtenidos se realizó por medio del software GeneSpring GX 12.0. Los datos originales fueron sometidos a un proceso de “limpieza” y normalización en tres pasos: 1) eliminación del ruido de fondo de modo individual; 2) transformación logarítmica de los valores de intensidad de la señal y normalización global empleando el percentil 75 y 3) transformación de la línea de base de datos por medio de la mediana de todas las muestras.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Antes de proceder al análisis estadístico, todos los arrays fueron sometidos a estrictos controles de calidad y filtros adecuados. A fin de sintetizar la información y reducir la dimensión de los datos obtenidos en los arrays se procedió a realizar un Análisis de Componentes Principales (PCA). Además, se empleó la prueba estadística t de Student (GeneSpring GX 12.0) para identificar genes diferencialmente expresados entre el grupo de estudio y el grupo control (nivel de significación 0.05), con test de corrección múltiple de Benjamini-Hochberg y *Fold Change* (Valor de cambio en intensidad de fluorescencia) ≥ 2 .

A través de DAVID (base de datos de anotación, visualización y descubrimiento integrado) y KEGG (Enciclopedia Kyoto de genes y genomas) se seleccionaron, anotaron y visualizaron genes por función y ruta (77, 78). Por medio de un software de edición de imágenes se representaron las rutas estadísticamente significativas obtenidas en el análisis (79). Los resultados obtenidos de los conjuntos de datos de cada microarray fueron colgados en el repositorio público de datos de microarrays GEO. (E-MTAB-3338, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

Validación de los resultados

Como dictan las guías MIAME, los cambios de expresión génica identificados se validaron por medio de PCR digital, empleando para ello la plataforma de PCR digital: este tipo de PCR permite la detección y cuantificación absoluta de secuencias de ácidos nucleicos. Con este sistema, la muestra es repartida en 20.000 nanogotas independientes, cada una de las cuales actuará como un contenedor individual para la

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

reacción de amplificación. El resultado es que cada gota contiene una o ninguna molécula produciendo por tanto una reacción positiva o negativa al realizar la amplificación de PCR, la cual se detecta mediante el uso de sondas y/o intercalantes fluorescentes.

Los pasos de la ddPCR (droplet digital Polymerase Chain Reaction) se resumen en: generación de gotas, realización de la PCR, lectura de las gotas y análisis. Para llevarlo a cabo, se diseñaron sondas y primers específicos para los genes más representativos del análisis (Figura 23).



RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

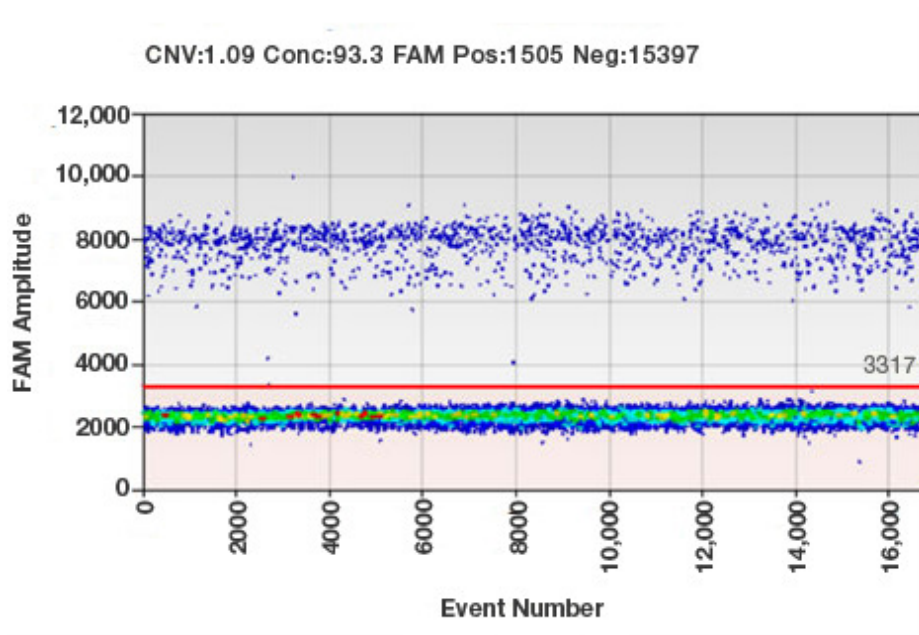


Figura 23. Etapas de la ddPCR: generación de gotas, PCR, lectura y análisis de los resultados. El gráfico de la parte inferior representa la intensidad de fluorescencia frente al número de gotas. Las gotas situadas por encima de la línea de base (color rojo) se consideran positivas y se les asigna un valor de 1, mientras que las gotas situadas por debajo de dicha línea se considerarán negativas asignándoles un valor de 0. A partir de las gotas positivas se determinará el número de copias/ μ l.

<http://www.bio-rad.com/es-es/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology>

Los *primers* y las sondas fueron suministrados por la empresa *Life Technologies* (Ensayos con sondas Taqman marcadas con el fluoróforo FAM y utilizando como gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). (Figura 24). Cada muestra se analizó por duplicado y la media obtenida se empleó en el análisis estadístico.

Los valores de expresión por ddPCR se normalizaron frente a los valores de expresión obtenidos para el gen constitutivo GAPDH, en cada una de las muestras. De este modo, se seleccionaron 2 genes diana y 1 gen control para la validación del estudio. Los genes seleccionados y el diseño de la placa fueron los siguientes:

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Genes diana:

COL27A1	Homo sapiens collagen, type XXVII, alpha 1 (COL27A1), mARN [NM_032888]	4.419513	up
COL5A1	Homo sapiens collagen, type V, alpha 1 (COL5A1), mARN [NM_000093]	4.381706	up

Genes de referencia:

GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Temperatura de anillamiento: 56,8 °C	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	IDRO	JJMO	MPBO	JIMO	51B	IDRO	JJMO	MPBO	JIMO	51B	CNORT27
B	RABO	PCFO	FVAO	AMBO	52B	RABO	PCFO	FVAO	AMBO	52B	CNORT5
C	TDGO	JEFPO	JCRO	AGGO	54B	TDGO	JEFPO	JCRO	AGGO	54B	BP27
D	AJJO	NCPO	JMDAO	CABO	56B	AJJO	NCPO	JMDAO	CABO	56B	BP5
E	RAMO	NNSO	MAGCO	JJAGO	57B	RAMO	NNSO	MAGO	JJAGO	57B	BC27
F	FLPRO	JLDO	MCBO	DMIO	58B	FLPRO	JLDO	MCBO	DMIO	58B	BC5
G	RGGO	MAGFO	JAFGO		59B	RGGO	MAGFO	JAFGO		59B	
H	EVGO	FLDJO	JAGMO		514B	EVGO	FLDJO	JAGMO		514B	

Figura 24: Diseño de la placa del protocolo ddPCR.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

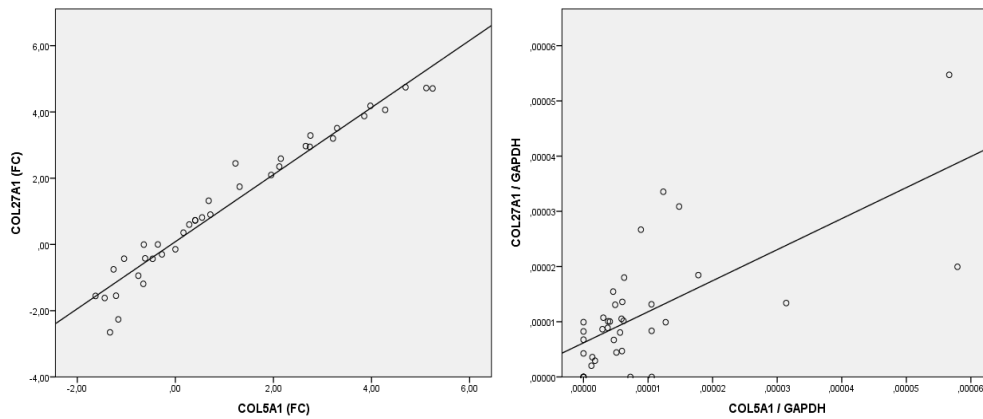


Figura 25: Validación de los resultados de los microarrays por PCR. Los resultados de los niveles de expresión obtenidos de los microarrays para COL27A1 y COL5A1 muestran una correlación positiva significativa, confirmada mediante PCR digital. FC: “Fold Change” o “Valor de Cambio”.

Análisis estadístico

Para analizar las diferencias en los niveles de expresión entre cirróticos terminales y controles sanos se empleó el software SPSS para Windows versión 20.0 (IBM-SPSS, Chicago, IL, USA).

Resultados

Resultados

Como se ha explicado en el apartado de material y métodos, este estudio se realizó sobre una cohorte de pacientes con diagnóstico de cirrosis en lista de espera de trasplante hepático. En ellos se estudiaron las características demográficas, clínicas y analíticas, así como los perfiles de expresión génica. Todos ellos fueron trasplantados, pero como se ha comentado previamente, las muestras postrasplante no pudieron ser analizadas por no presentar las muestras una concentración de ARNm suficiente.

1. Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes

La mayoría de nuestros pacientes eran hombres (70%). La edad media de los pacientes fue de 57,4 años con una desviación estándar (DE) de 6,8 años. El abuso de alcohol fue la causa más frecuente de cirrosis. De los treinta pacientes que componen nuestra cohorte, once presentaban además hepatocarcinoma (HCC, 36.6%) y ocho estaban infectados por el virus de la Hepatitis C (26.6%).

Pacientes con hepatocarcinoma

Once de los treinta pacientes estaban afectados de hepatocarcinoma (36.7%). La media de edad de estos pacientes fue de 58,3 años (DE: 9,4) mientras que la de los pacientes sin hepatocarcinoma fue de 56,8 (DE: 7,1). No hubo diferencias estadísticas en la edad entre los grupos de pacientes.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Los datos demográficos y las características clínicas de los pacientes se recogen en una tabla de descriptivos clínicos (Tabla 8). 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.

	COHORTE TOTAL (n = 30)	HEPATOCARCINOMA (n= 11)	NO HEPATOCARCINOMA (n= 19)	p	Valores Normales de Referencia
Edad (Media ± DE)	57.4 ± 6.8	58.3 ± 9.4	56.8 ± 7.1	n.s.	
Varones, n (%)	21 (70)	8 (27)	13 (43)	n.s.	
VHC	3(10)	1 (3.3)	2 (6.4)	n.s.	
Alcoholismo	17(58)	6 (20)	11 (38)	n.s.	
VHC+ Alcoholismo	5(16)	3 (10)	2 (6.4)	n.s.	
Otras causas:	5(16)	1 (3.3)	4 (12.8)	n.s.	
Diabetes Mellitus II	8(26)	3 (10)	5 (16)	n.s.	
HTA	11(36)	6(20)	5 (16)	n.s.	
Puntuación MELD	11.8 ± 3.8	9.5 ± 2.7	13.2 ± 3.7	0.015	
Hemoglobina (g/dl)	11,5 ± 2,4	12.6 ± 2,7	10.8 ± 1.9	n.s.	13.2-16.8
Leucocitos (x10 ³ /μl)	5243.3 ± 3328.1	4572.7 ± 2038	5631.6 ± 3887.2	n.s.	4-10.5
Neutrófilos (%)	64.2 ± 16.4	63.3 ± 17.8	64.6 ± 15.8	n.s.	41-72
Plaquetas (x10 ³ /μl)	91.5 ± 48.9	89.2 ± 35.1	94.6 ± 56.1	n.s.	150-350
Tiempo Protrombina (segundos)	78.6 ± 20.2	88.6 ± 16.3	72.7 ± 20.4	0.030	60-140
INR	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1,3 ± 0.4	0.007	0.8-1.2
Glucosa (mg/dl)	142.6 ± 76.7	155 ± 87.0	134.8 ± 68.9	n.s.	82-115
Albúmina (g/dl)	3.4 ± 0.8	3.5 ± 0.6	2.9 ± 0.8	0.006	3.5-4.6
Bilirrubina (mg/dl)	2.5 ± 1.8	2.0 ± 1.3	2.9 ± 2.0	0.021	0.2-1.1
Colesterol (mg/dl)	150.5 ± 43.5	159.4 ± 32.9	143.6 ± 54.5	n.s.	<200
Triglicéridos (mg/dl)	96.5 ± 42.4	100.8 ± 51.3	83.1 ± 30,6	n.s.	<150
PCR (mg/l)	30.8 ± 81.6	12.9 ± 25.7	50.0 ± 117.8	n.s.	0-10
Ácido Úrico (mg/dl)	6.9 ± 2.6	6.3 ± 2.2	6.7 ± 3.2	n.s.	2.6-6
AST (U/L)	78.0 ± 92.7	73 ± 45.4	84.0 ± 108.2	n.s.	0-50
ALT (U/L)	66 ± 55.6	87 ± 75.9	58.0 ± 34.9	n.s.	1.0-55
GGT (U/L)	160.1 ± 203.9	173.8 ± 224.5	136.4 ± 185.5	n.s.	0-55
ALP (U/L)	190.4 ± 171.5	169.4 ± 91.3	209.5 ± 224.6	n.s.	30-120

Tabla 8: Características clínicas de los pacientes estratificados por la presencia/ausencia de hepatocarcinoma. VHC: Virus de la Hepatitis C; HTA: hipertensión arterial; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; ALP: fosfatasa alcalina; INR: Índice de Coagulación Internacional Normalizado; Puntuación MELD (*Model for End-stage Liver Disease*, Modelo de enfermedad hepática en estadio terminal); n.s: no significativo.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

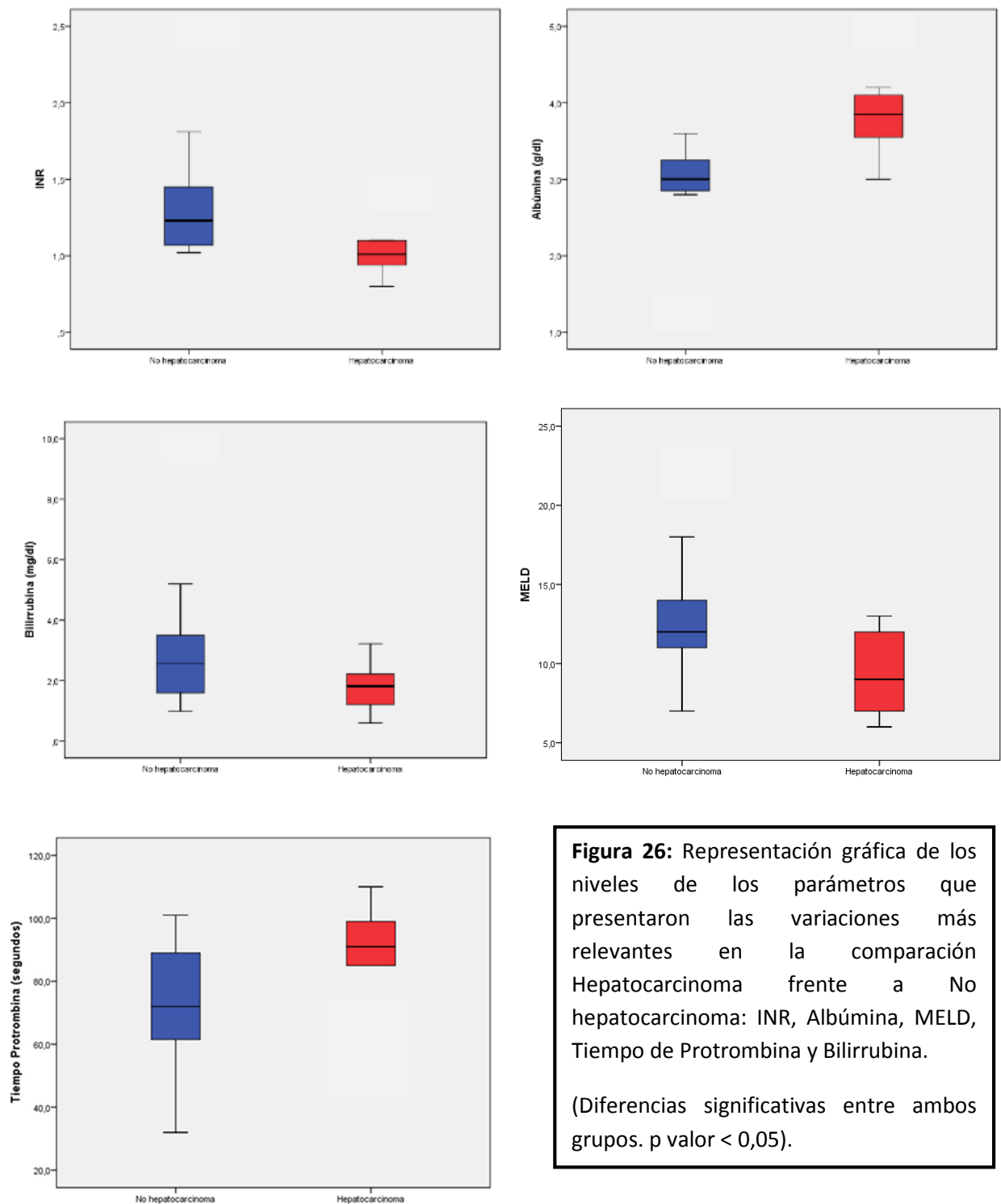
Las comorbilidades más frecuentes fueron hipertensión arterial y diabetes mellitus, siendo más frecuente la primera en los pacientes afectados de hepatocarcinoma y la diabetes en el grupo de pacientes sin hepatocarcinoma. La puntuación MELD media fue de 11.8, siendo superior en el subgrupo de pacientes que no presentaban hepatocarcinoma de modo estadísticamente significativo: 13.2 (DE: 3.7) vs 9.5 (DE: 2.7). Asimismo, los pacientes sin hepatocarcinoma presentaban niveles más bajos de albúmina y más elevados de bilirrubina e INR respecto al subgrupo sin hepatocarcinoma (diferencias estadísticamente significativas). En ambos, el recuento plaquetario estaba por debajo del rango de normalidad mientras que los niveles de Proteína C Reactiva, AST, ALT, GGT y ALP se hallan por encima.



Etiología cirrosis	Pacientes que presentaron Hepatocarcinoma
Enfermedad Alcohólica	6
VHC+Enfermedad alcohólica	4
Otras causas	1

Tabla 9: Etiología de la cirrosis en los pacientes con hepatocarcinoma.

En el paciente que desarrolló cirrosis con hepatocarcinoma por otras causas, fue como consecuencia de hemocromatosis.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS



 No hepatocarcinoma
 Hepatocarcinoma

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Dos de los treinta pacientes de nuestra cohorte fallecieron tras el trasplante: uno de ellos falleció tres días después por hemorragia abdominal postoperatoria con trombosis de la arteria hepática y disfunción del injerto. La causa de exitus del otro paciente fue un fallo hepático de origen isquémico secundario probablemente a obstrucción de drenaje venoso (este último presentaba además hepatocarcinoma).

Presencia/ausencia de Rechazo Agudo Leve

Desde un punto de vista histopatológico, el Rechazo Agudo Leve (RAL) se define según el Sistema de Gradificación InteARNmcional (80) por la presencia de un infiltrado inflamatorio mixto leve confinado a espacios porta constituido por linfocitos activados, polimorfonucleares y eosinófilos. Se produce entre los días 5 y 30 post-trasplante y es de carácter reversible.

Las manifestaciones clínicas oscilan desde pacientes totalmente asintomáticos hasta la presencia de fiebre, ictericia y mal estado general. Respecto a alteraciones en la bioquímica, destaca el incremento de GOT, GPT, FA, GGT y bilirrubina. No obstante, la alteración de la bioquímica hepática es inespecífica y es preciso un diagnóstico diferencial con otro tipo de complicaciones post-trasplante, tales como eventos isquémicos, biliares, infecciones, etc.

En la tabla 10 se muestran, del mismo modo que en el caso anterior, las características clínicas y demográficas de nuestra cohorte de pacientes, estratificados por la presencia/ausencia de rechazo agudo leve. La puntuación MELD, el porcentaje de

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

neutrófilos y los valores de bilirrubina total presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos subgrupos:

	COHORTE TOTAL (n = 30)	RECHAZO AGUDO LEVE (n= 9)	NO RECHAZO AGUDO LEVE (n= 21)	p	Valores Normales de Referencia
Edad (Media ± DE)	57.4 ± 6.8	55.05 ± 7.88	57.9 ± 6.4	n.s.	
Varones, n (%)	21 (70)	7 (23)	17 ()	n.s.	
VHC	3(10)	2 (7)		n.s.	
Alcoholismo	17(58)	5 (17)		n.s.	
VHC+ Alcoholismo	5(16)	1 (3.5)		n.s.	
Otras causas:	5(16)	1 (3.5)		n.s.	
Diabetes Mellitus II	8(26)	4 (14)	4 ()	n.s.	
HTA	11(36)	2(7)	9 ()	n.s.	
Puntuación MELD	11.8 ± 3.8	13.9 ± 2.9	10.3 ± 3.7	0.013	
Hemoglobina (g/dl)	11.5 ± 2.4	11.5 ± 0.9	11.1 ± 2.8	n.s.	13.2-16.8
Leucocitos (x10³/μl)	5243.3 ± 3328.1	3545.0 ± 1118.0	4968.3 ± 3746.5	n.s.	4-10.5
Neutrófilos (%)	64.2 ± 16.4	52.2 ± 16.39	66.6 ± 14.6	0.039	41-72
Plaquetas (x10³/μl)	91.5 ± 48.9	71.7 ± 35.2	83.8 ± 53.7	n.s.	150-350
Tiempo Protrombina (segundos)	78.6 ± 20.2	70.6 ± 17.1	77.6 ± 21.3	n.s.	60-140
INR	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.4	n.s.	0.8-1.2
Glucosa (mg/dl)	142.6 ± 76.7	133.3 ± 82.1	127.1 ± 74.9	n.s.	82-115
Albúmina (g/dl)	3.4 ± 0.8	3.2 ± 0.6	3.1 ± 0.9	n.s.	3.5-4.6
Bilirrubina (mg/dl)	2.5 ± 1.8	3.3 ± 2.5	1.8 ± 1.1	0.014	0.2-1.1
Colesterol (mg/dl)	150.5 ± 43.5	153.2 ± 41.6	144.1 ± 45.1	n.s.	<200
Triglicéridos (mg/dl)	96.5 ± 42.4	69.9 ± 0.7	92.8 ± 46.6	n.s.	<150
PCR (mg/l)	30.8 ± 81.6	2.7 ± 1.6	9.1 ± 94.3	n.s.	0-10
Ácido Úrico (mg/dl)	6.9 ± 2.6	6.3 ± 2.5	5.9 ± 2.9	n.s.	2.6-6
AST (U/L)	78.0 ± 92.7	58.9 ± 22.9	61.6 ± 105.8	n.s.	0-50
ALT (U/L)	66 ± 55.6	44.5 ± 21.7	130.0 ± 63.0	n.s.	1.0-55
GGT (U/L)	160.1 ± 203.9	53.5 ± 36.3	116.1 ± 227.9	n.s.	0-55
ALP (U/L)	190.4 ± 171.5	175.0 ± 55.2	142.7 ± 202.2	n.s.	30-120

Tabla 10: Características clínicas de los pacientes estratificados por la presencia/ausencia de rechazo agudo leve. VHC: Virus de la Hepatitis C; HTA: hipertensión arterial; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; ALP: fosfatasa alcalina; INR: Índice de Coagulación Internacional Normalizado; Puntuación MELD (*Model for End-stage Liver Disease*, Modelo de enfermedad hepática en estadio terminal); n.s: no significativo.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

De nuestros 30 pacientes, 9 presentaron RAL tras la realización del trasplante: de éstos, cinco habían llegado al estadio de cirrosis por enfermedad alcohólica, dos por infección por VHC, uno por la combinación VHC y enfermedad alcohólica y otro por colangitis:

Etiología cirrosis	Pacientes que presentaron Rechazo Agudo Leve
Enfermedad Alcohólica	5
VHC y VHC+Enfermedad alcohólica	3
Otras causas	1

Tabla 11: Causas de cirrosis en los pacientes que presentaron Rechazo Agudo Leve.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

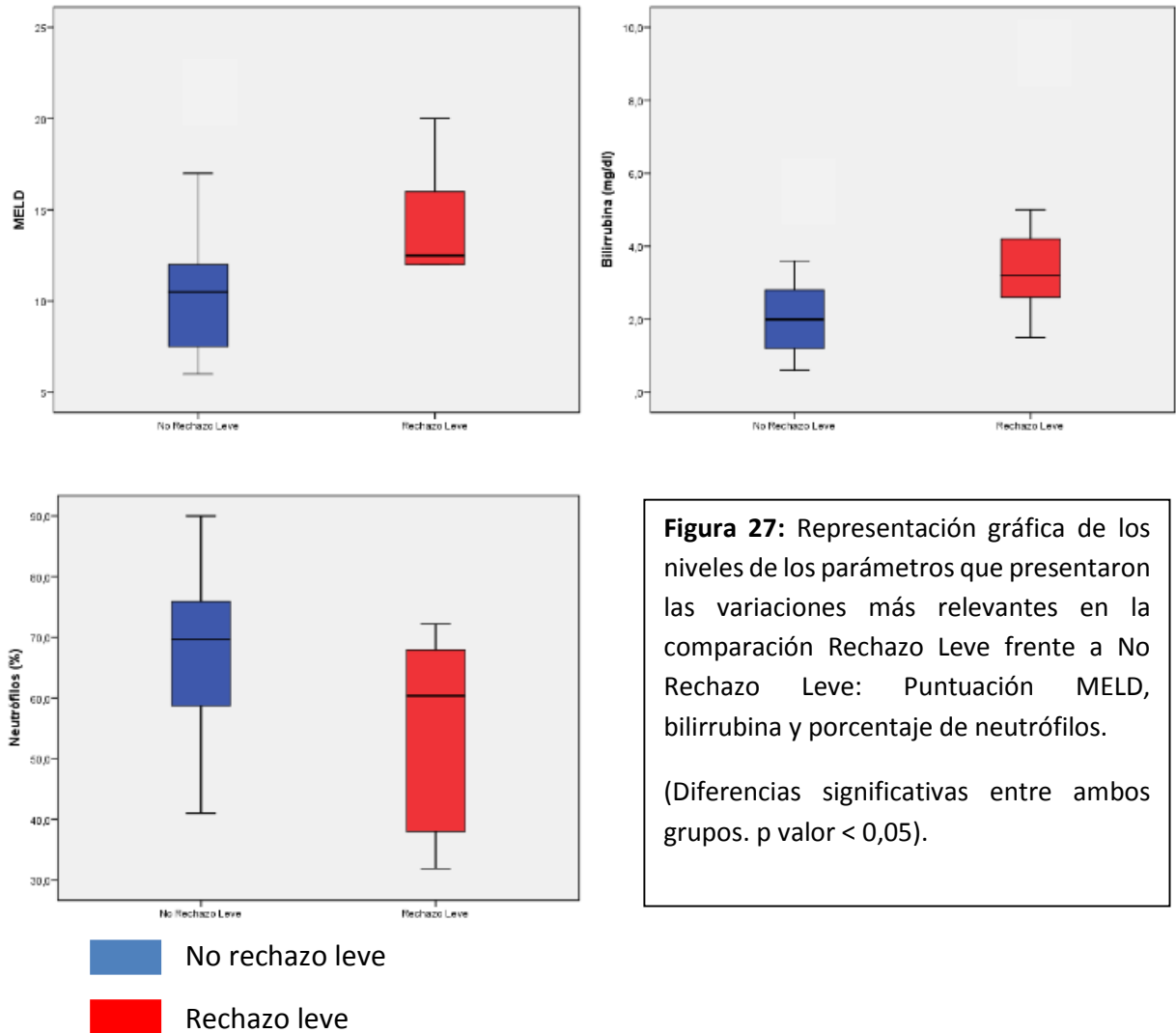


Figura 27: Representación gráfica de los niveles de los parámetros que presentaron las variaciones más relevantes en la comparación Rechazo Leve frente a No Rechazo Leve: Puntuación MELD, bilirrubina y porcentaje de neutrófilos.

(Diferencias significativas entre ambos grupos. p valor $< 0,05$).

2. Evaluación de los perfiles de expresión génica

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 12.0. 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

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

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 una ratio >2 o < -2 , entre los diferentes grupos.

Tal y como se ha dicho anteriormente, la puntuación MELD obtenida en el subgrupo de pacientes con hepatocarcinoma fue inferior respecto al subgrupo que presentaba hepatocarcinoma. Para comprobar si este hallazgo podía influir en los diferentes perfiles de expresión génica (PEG), hemos realizado una comparación de PEG entre ambos subgrupos. El análisis realizado puso de manifiesto que no existían diferencias entre ambos grupos, por tanto, fueron considerados como uno solo en análisis posteriores. Teniendo en cuenta esto, el siguiente paso consistió en realizar una comparación general de casos (pacientes cirróticos terminales sometidos a trasplante) frente a controles sanos. Se llevó a cabo el mismo procedimiento estratificando en esta ocasión en función de la presencia/ausencia de rechazo agudo leve y tampoco se observaron diferencias entre ambos subgrupos a nivel de expresión génica.

Comparación de los niveles de expresión génica entre pacientes y controles

Como resultado de esta comparación, se obtuvieron 3402 genes diferencialmente expresados, de los que 2802 estaban sobre-expresados y 600 se hallaban infra-expresados (Anexo 4).

Identificación de las rutas de señalización intracelular que caracterizan al paciente cirrótico terminal.

A partir de la lista de los genes cuyos niveles de expresión fueron estadísticamente diferentes entre ambos grupos, el análisis por medio de DAVID/KEGG reveló que estos genes participaban en tres grupos principales de rutas de señalización intracelular (Anexo 4). Aparecen destacadas las rutas identificadas por el análisis con un nivel de significación $p < 0.05$. Los pacientes presentaron niveles de expresión relativamente mayores de un grupo de genes que participan en la respuesta fibrótica, así como en la génesis de condiciones pro-inflamatorias que activan dicha respuesta (Figuras 28-40, Tablas 13-25).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Rutas KEGG	p Valor	Benjamini
1. Metabolismo de serina, glicina y treonina	2.9 E-3	4.2 E-1
2. Interacciones entre moléculas de adhesión celular (CAMs)	4.7 E-3	3.6 E-1
3. Interacción receptor-matriz extracelular	5.5 E-3	2.9 E-1
4. Metabolismo de fenilalanina	1.3 E-2	4.7 E-1
5. Metabolismo de tirosina	1.5 E-2	4.3 E-1
6. Transportadores ABC	1.5 E-2	4.3 E-1
7. Ruta del Factor de Crecimiento Transformante tipo β	3.4 E-2	6.6 E-1
8. Contracción del músculo cardiaco	5.0 E-2	7.5 E-1
9. Metabolismo de purinas	5.2 E-2	7.1 E-1
10. Miocardiopatía dilatada	5.4 E-2	6.8 E-1
11. Inmunodeficiencia primaria	5.8 E-2	6.7 E-1
12. Uniones de adherencia	8.4 E-2	7.8 E-1
13. Miocardiopatía hipertrófica (HCM)	9.3 E-2	7.8 E-1

Tabla 12: Rutas identificadas por DAVID/KEGG

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

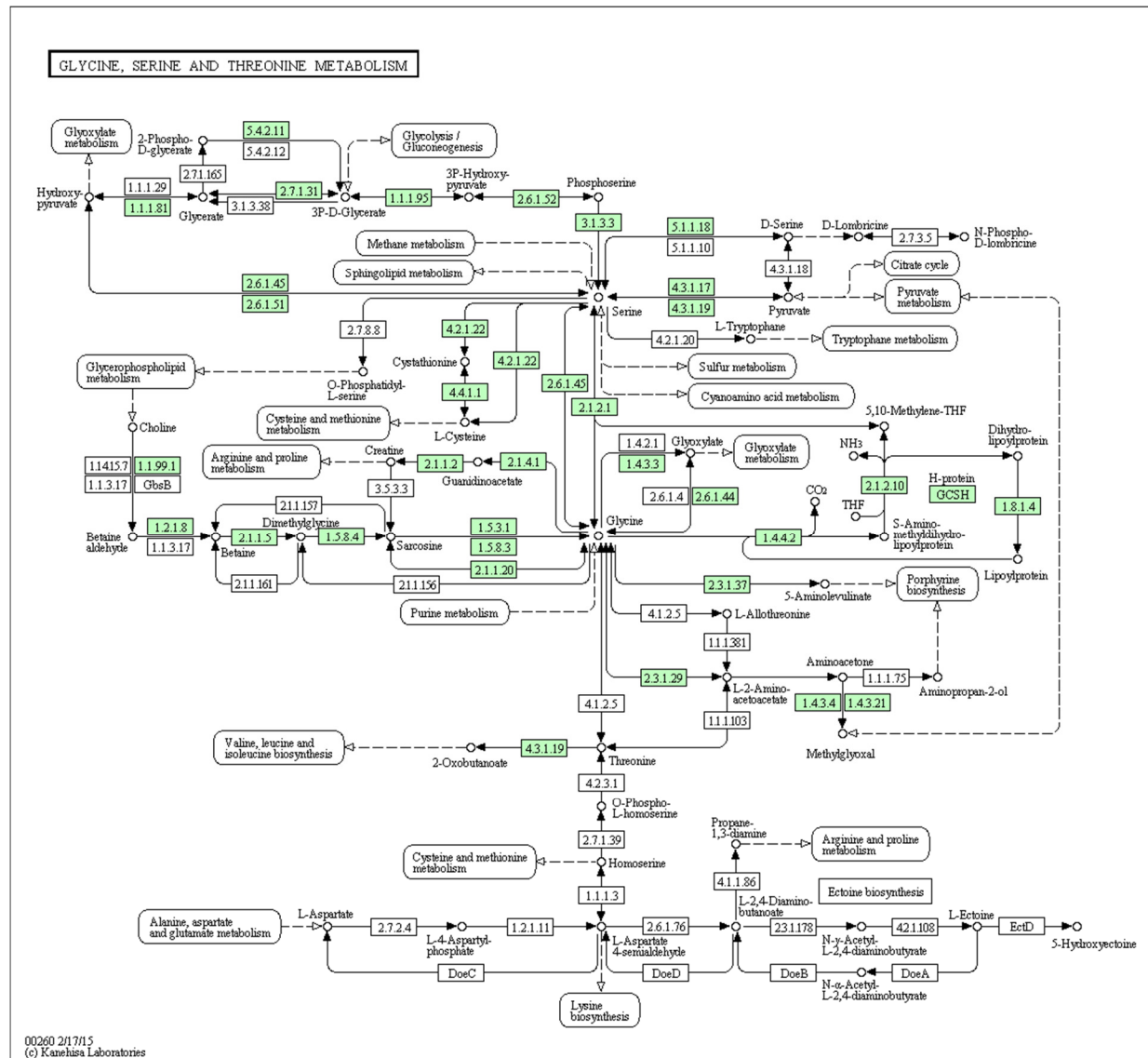


Figura 28: Metabolismo de serina, glicina y treonina.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 13: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con el metabolismo de los aminoácidos glicina, serina y treonina.

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (<i>Fold Change</i>)
Metabolismo de glicina, serina y treonina	ALAS2	Homo sapiens aminolevulinate, delta-, synThase 2	3.93
	C20orf62	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 62	2.93
	GCAT	Homo sapiens glycine C-acetyltransferase	2.37
	GATM	Homo sapiens glycine amidinotransferase	-2.97
	PH6DH	Homo sapiens phosphoglycerate dehydrogenase	-2.61
	PIPOX	Homo sapiens pipecolic acid oxidase	2.84
	SDS	Homo sapiens serine dehydratase	2.05

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

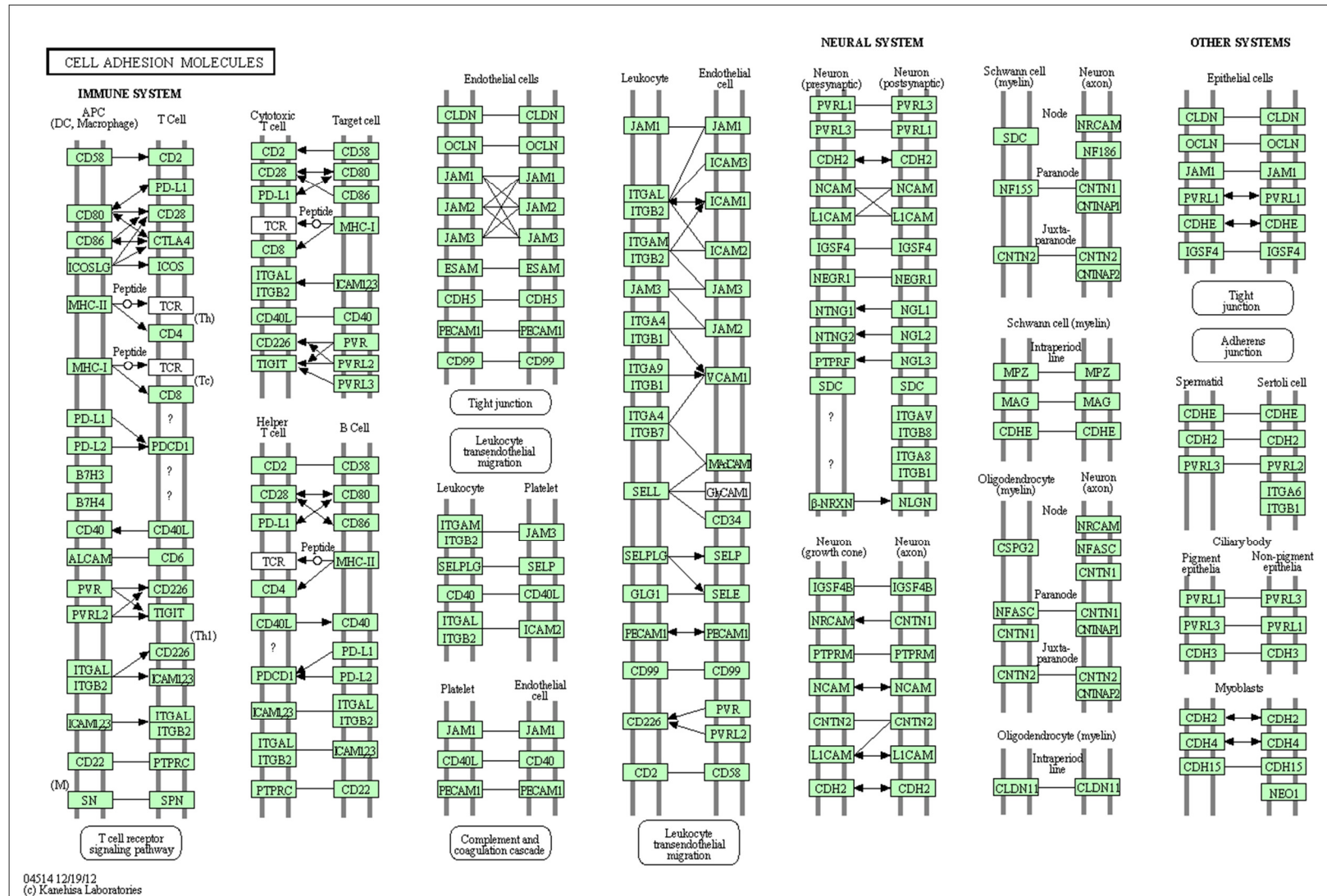


Figura 29:

Interacciones
entre moléculas
de adhesión
celular (CAMs)

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 14: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con las moléculas de adhesión celular (CAMs).

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Moléculas de adhesión celular	CD276	Homo sapiens CD276 molecule	2.49
	CD4	Homo sapiens CD4 molecule	2.71
	CD40L	Homo sapiens CD40 ligand	-2.37
	CD6	Homo sapiens CD6 molecule	-2.39
	CD80	Homo sapiens CD80 molecule	2.95
	CD8a	Homo sapiens CD8a molecule	-2.66
	CD8b	Homo sapiens CD8b molecule	-2.70
	CDH3	Homo sapiens cadherin3 type1	3.00
	CLDN16	Homo sapiens claudin 16	4.00
	CLDN19	Homo sapiens claudin 19	2.78
	CLDN5	Homo sapiens claudin 5	-2.49
	CLDN10	Homo sapiens claudin 10	4.55
	CNTNAP5	Homo sapiens contactin associated protein-like 5	3.20
	ESAM	Homo sapiens endoThelial cell adhesion molecule	2.28
	ICOSLG	Homo sapiens inducible T-cell co-stimulator ligand	2.63
	ITGA9	Homo sapiens integrin, alpha 9	2.09
	ITGA6	Homo sapiens integrin, alpha 6	-2.53
JAM3	Homo sapiens junctional adhesion molecule 3	-2.05	

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

	HLA-A	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, A	2.20
	MAG	Homo sapiens myelin associated glycoprotein	2.04
	NEO1	Homo sapiens neogenin 1	3.31
	NCAM2	Homo sapiens neural cell adhesion molecule 2	2.62
	NFASC	Homo sapiens neurofascin	4.19
	NRCAM	Homo sapiens neuronal cell adhesion molecule	-2.83
	NEGR1	Homo sapiens neuronal growth regulator 1	2.91
	PVRL1	Homo sapiens poliovirus receptor-related 1	2.72
	PTPRF	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	2.58
	SDC4	Homo sapiens syndecan 4	2.06

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

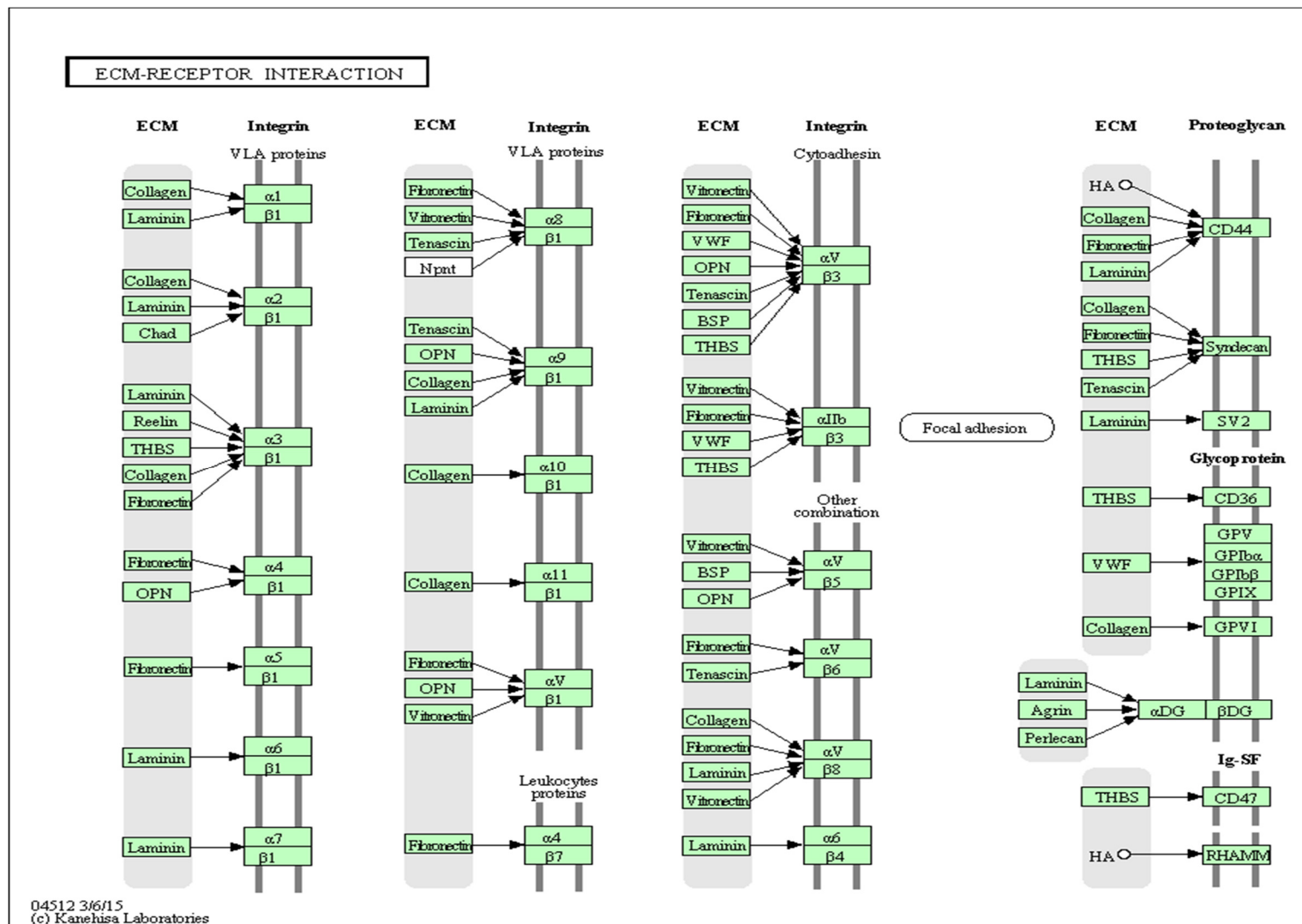


Figura 30: Interacciones receptor-matriz extracelular

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 15: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con las interacciones receptor-matriz extracelular.

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Matriz extracelular	AGRN	Homo sapiens agrin	4.49
	CHAD	Homo sapiens chondroadherin	2.11
	COL4A4	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 4	-2.21
	COL4A6	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 6	7.53
	COL5A1	Homo sapiens collagen, type V, alpha 1	4.38
	COL5A3	Homo sapiens collagen, type V, alpha 3	-2.82
	COL6A2	Homo sapiens collagen, type VI, alpha 2	-3.53
	COL11A2	Homo sapiens collagen, type XI, alpha 2	6.22
	GP5	Homo sapiens glycoprotein V (platelet)	-2.21
	HSPG2	Homo sapiens heparan sulfate proteoglycan 2	2.20
	ITGA6	Homo sapiens integrin, alpha 6	-2.53
	ITGA9	Homo sapiens integrin, alpha 9	2.09
	LAMA3	Homo sapiens laminin, alpha 3	3.35
	LAMB1	Homo sapiens laminin, beta 1	2.97
	LAMC1	Homo sapiens laminin gamma3	2.59
	SV2A	Homo sapiens synaptic vesicle glycoprotein 2A	3.65
	SV2C	Homo sapiens synaptic vesicle glycoprotein 2C	3.02
	SDC4	Homo sapiens syndecan 4	2.06
	TNXB	Homo sapiens tenascin XB	2.28
THBS1	Homo sapiens tenascin XB	3.17	

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 16: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con el metabolismo de fenilalanina.

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Metabolismo de fenilalanina	HPD	Homo sapiens 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	2.11
	ALDH3B1	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	2.65
	ALDH3A1	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	2.07
	AOC2	Homo sapiens amine oxidase, copper containing 2	2.42
	MAOA	Homo sapiens monoamine oxidase A	5.81
	MAOB	Homo sapiens monoamine oxidase B	2.86
	PRDX6	Homo sapiens peroxiredoxin 6	3.21
	TAT	Homo sapiens tyrosine aminotransferase (TAT)	8.68

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 17: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con el metabolismo de tirosina.

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (<i>Fold Change</i>)
Metabolismo de tirosina	HPD	Homo sapiens 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	2.11
	ALDH3B1	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	2.65
	ALDH3A1	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	2.07
	AOC2	Homo sapiens amine oxidase, copper containing 2	2.42
	MAOA	Homo sapiens monoamine oxidase A	5.81
	MAOB	Homo sapiens monoamine oxidase B	2.86
	TAT	Homo sapiens tyrosine aminotransferase (TAT)	8.68
	HEMK1	Homo sapiens HemK meThyltransferase family member 1	-2.11
	DDTL	Homo sapiens D-dopachrome tautomerase-like	-3.41
	HGD	Homo sapiens homogentisate 1,2-dioxygenase	-2.25
	PNMT	Homo sapiens phenylethanolamine N-methyltransferase	-2.57
	TH	Homo sapiens tyrosine hydroxylase	2.23

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

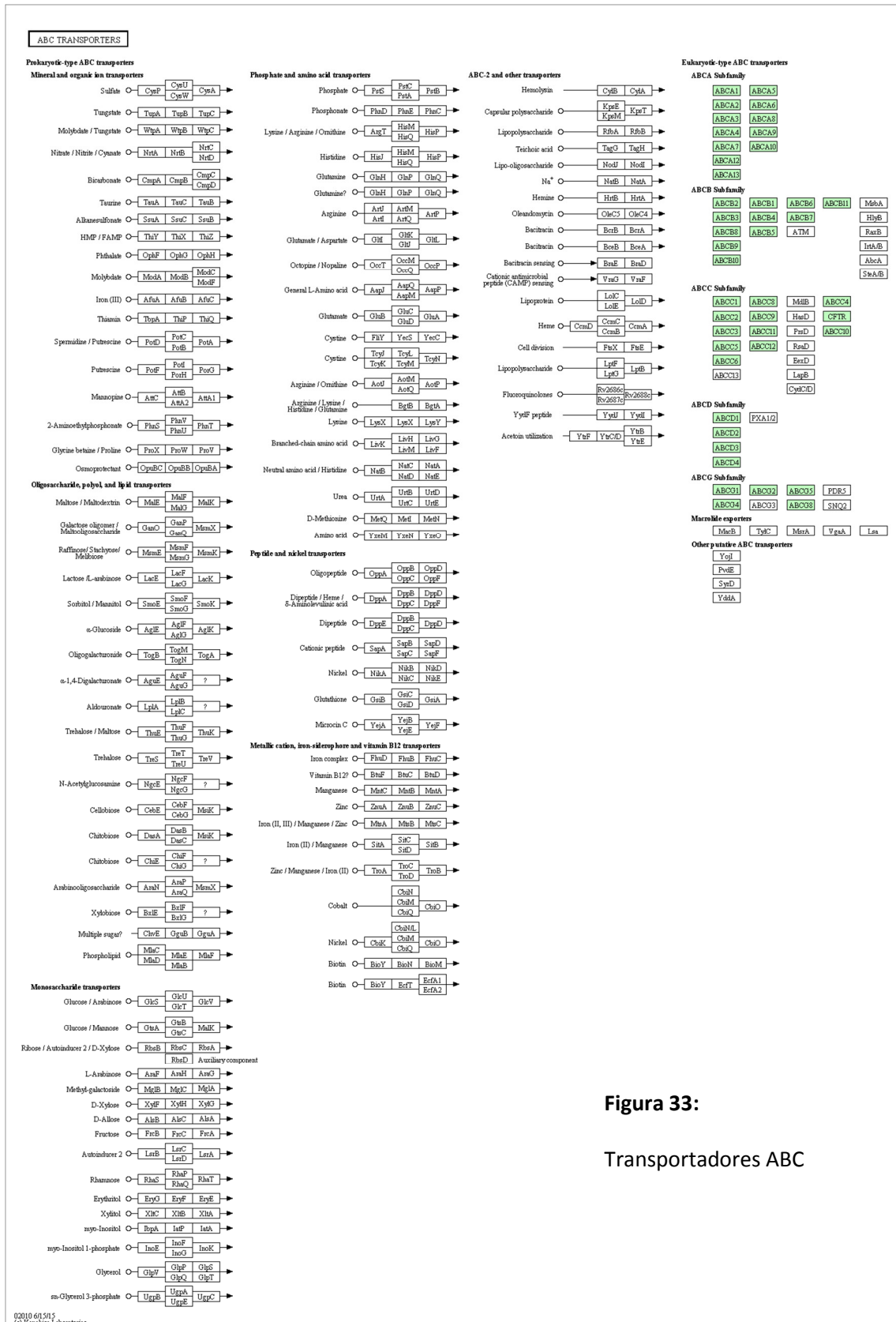


Figura 33:
Transportadores ABC

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 18: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con los transportadores ABC

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Transportadores ABC	ABCC13	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 13, pseudogene (ABCC13), transcript variant D, non-coding ARNM [NR_003088]	4.74
	ABCD4	Homo sapiens cDNA FLJ43119 fis, clone CTONG3003179. [AK125109]	4.69
	ABCC10	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10 (ABCC10), transcript variant MRP7A, mARNM [NM_033450]	4.36
	ABCA2	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2 (ABCA2), transcript variant 1, mARNM [NM_001606]	2.92
	ABCC4	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4 (ABCC4), transcript variant 1, mARNM [NM_005845]	2.78
	ABCG2	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2), mARNM [NM_004827]	2.71
	ABCA1	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1 (ABCA1), mARNM [NM_005502]	2.44
	ABCC6	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6 (ABCC6), transcript variant 2, mARNM [NM_001079528]	2.41
	ABCC5	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5 (ABCC5), transcript variant 2, mARNM [NM_001023587]	2.14
	ABCC8	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8 (ABCC8), mARNM [NM_000352]	2.02
	ABCB1	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1), mARNM [NM_000927]	-2.02
	ABCB8	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8 (ABCB8), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_007188]	-2.09
	ABCA3	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3 (ABCA3), mARNM [NM_001089]	-2.42

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

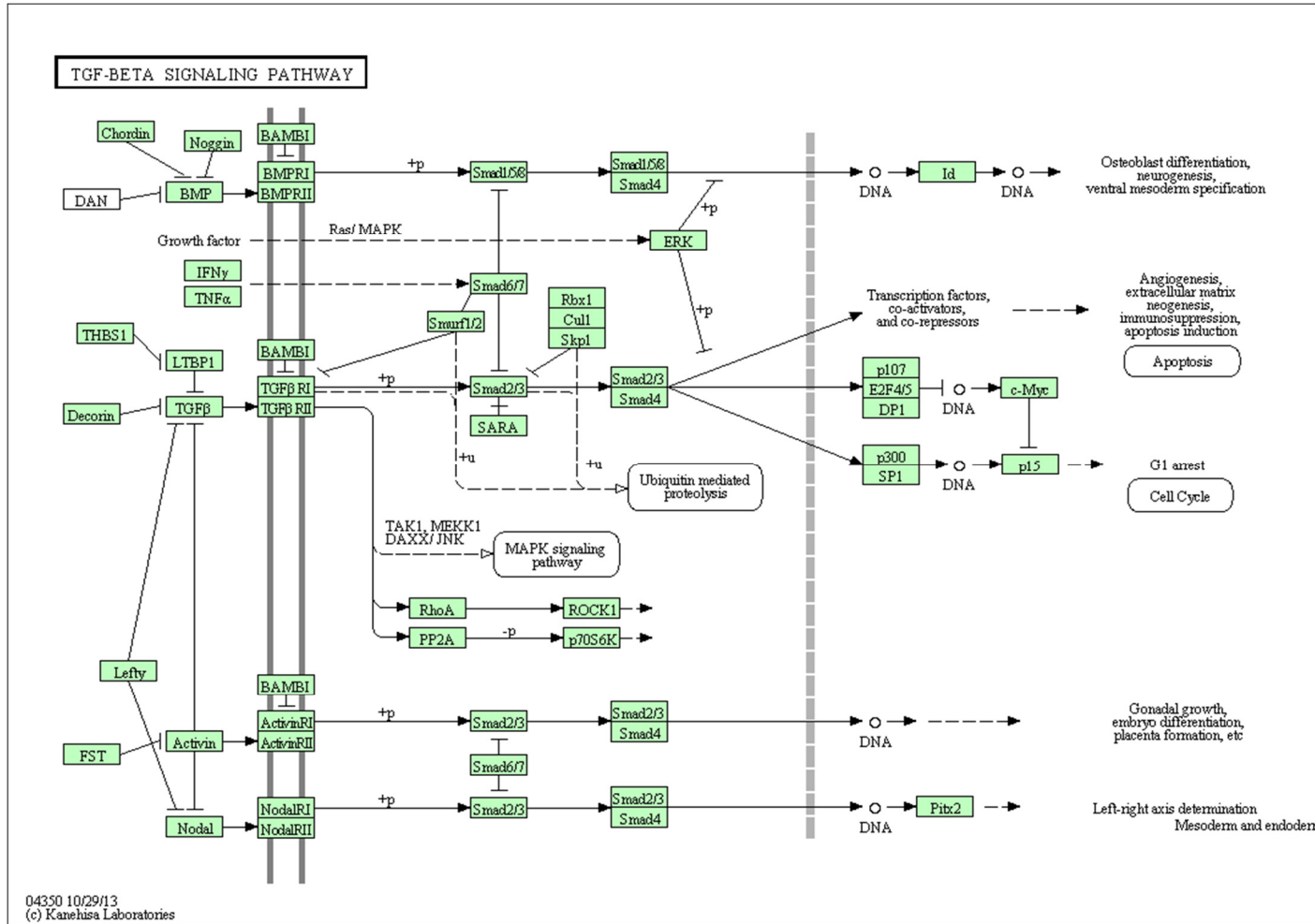


Figura 34: Ruta del Factor de Crecimiento Transformante tipo β

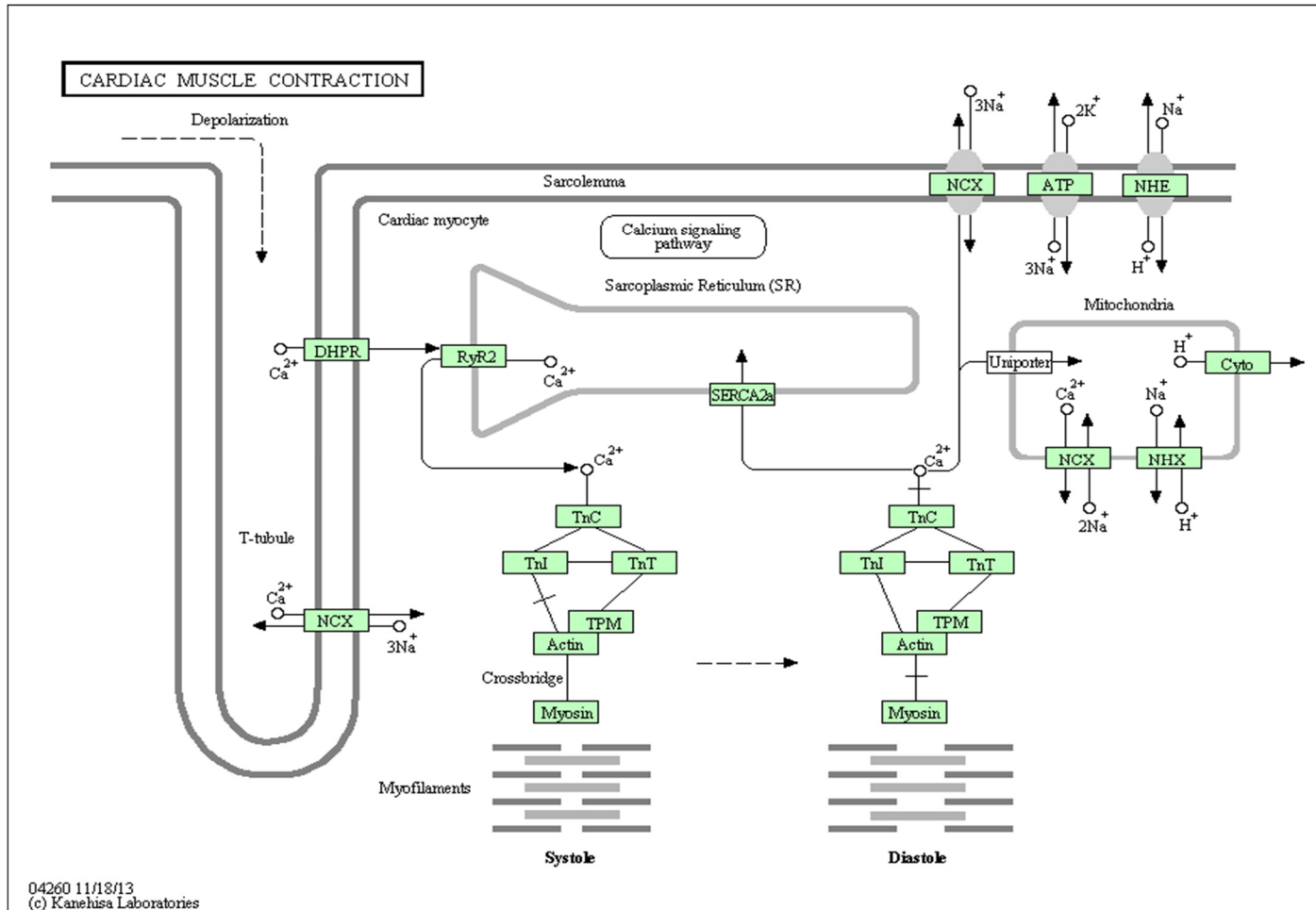
RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 19: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con la ruta del Factor de Crecimiento Transformante tipo β

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Factor de crecimiento transformante tipo-β	SMAD5	Homo sapiens SMAD family member 5	2.39
	SMAD9	Homo sapiens SMAD family member 9	2.98
	ACVRL1	Homo sapiens activin A receptor type II-like 1	2.03
	ACVR1C	Homo sapiens activin A receptor, type IC	-2.18
	CHRD	Homo sapiens chordin	2.58
	GDF5	Homo sapiens growth differentiation factor 5	2.56
	INHBC	Homo sapiens inhibin, beta C	3.34
	INHBE	Homo sapiens inhibin, beta E	3.70
	LTBP1	Homo sapiens latent transforming growth factor beta binding protein 1	2.85
	LEFTY1	Homo sapiens left-right determination factor 1	-2.33
	NOG	Homo sapiens noggin	-4.52
	RHOA	ras homolog gene family, member A	2.06
	NKX1-2	Homo sapiens NK1 homeobox 2	3.17
	THBS1	Homo sapiens Thrombospondin 1	3.17
	TFDP1	Homo sapiens transcription factor Dp-1	3.08
	MYCL1	Homo sapiens v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1	2.09
ZFYVE9	Homo sapiens zinc finger, FYVE domain containing 9	-2.39	

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Figura 35: Ruta de la contracción del músculo cardiaco



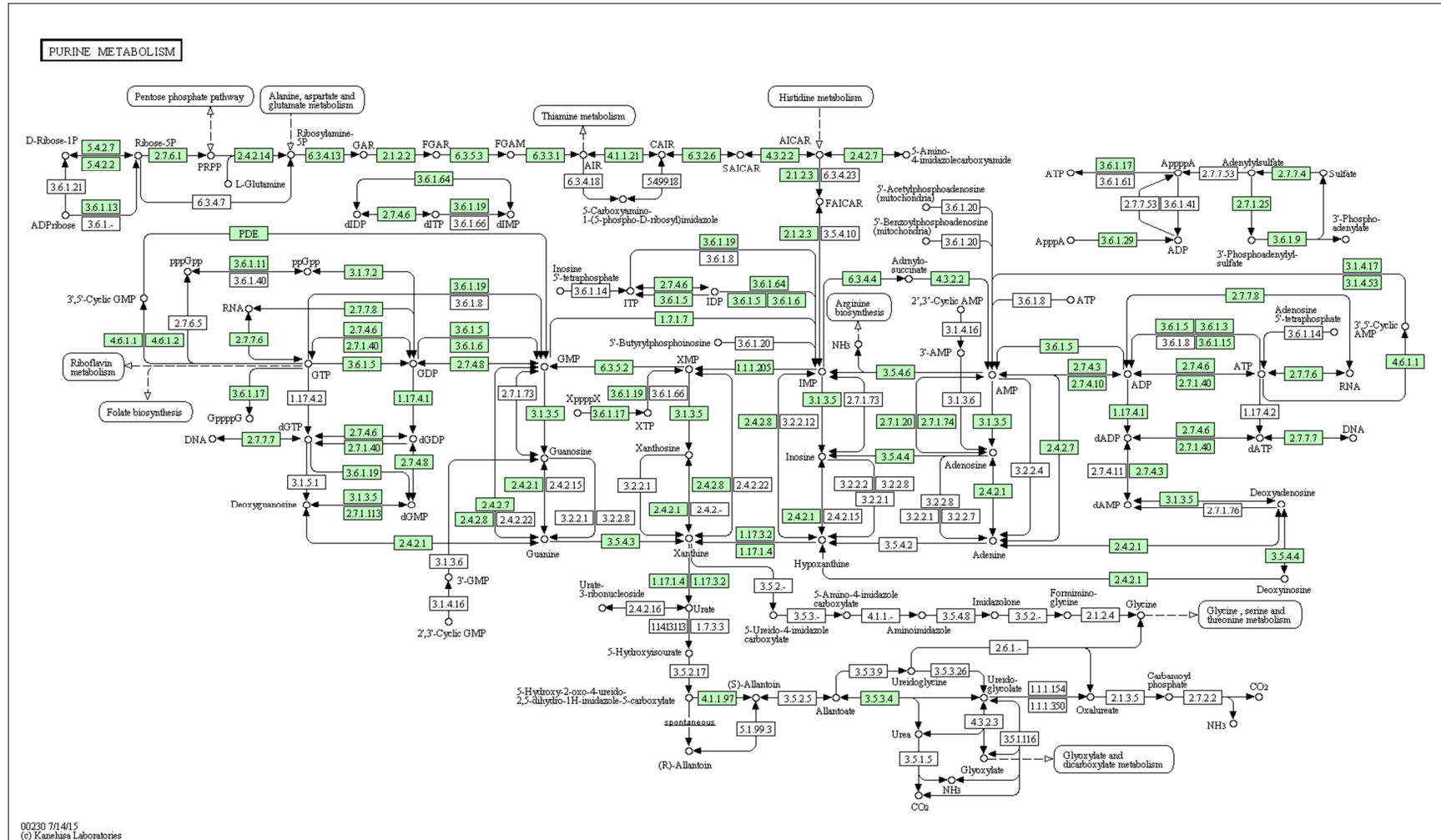
RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 20: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con la ruta de la contracción del músculo cardíaco

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Contracción músculo cardíaco	ATP1B2	Homo sapiens ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide	3.11
	ATP1A3	Homo sapiens ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide	2.73
	CACNA1S	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit	2.00
	CACNB4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	-2.45
	CACNG4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	2.03
	CACNG5	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5	3.07
	CACNG6	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	-2.09
	CACNG8	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8	2.84
	COX6B2	Homo sapiens cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 2	2.81
	COX7C	Homo sapiens cytochrome c oxidase subunit VIIc (COX7C)	2.27
	COX6B2	Homo sapiens cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 2	2.88
	UQCR11	Homo sapiens ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit XI	3.35
	SLC8A1	Homo sapiens solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger)	3.03
	TPM1	Homo sapiens tropomyosin 1	3.01
	TPM2	Homo sapiens tropomyosin 2	-2.30
UQCRB	Homo sapiens ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	2.33	

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Figura 36: Ruta del metabolismo de las purinas



RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 21: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con el metabolismo de las purinas

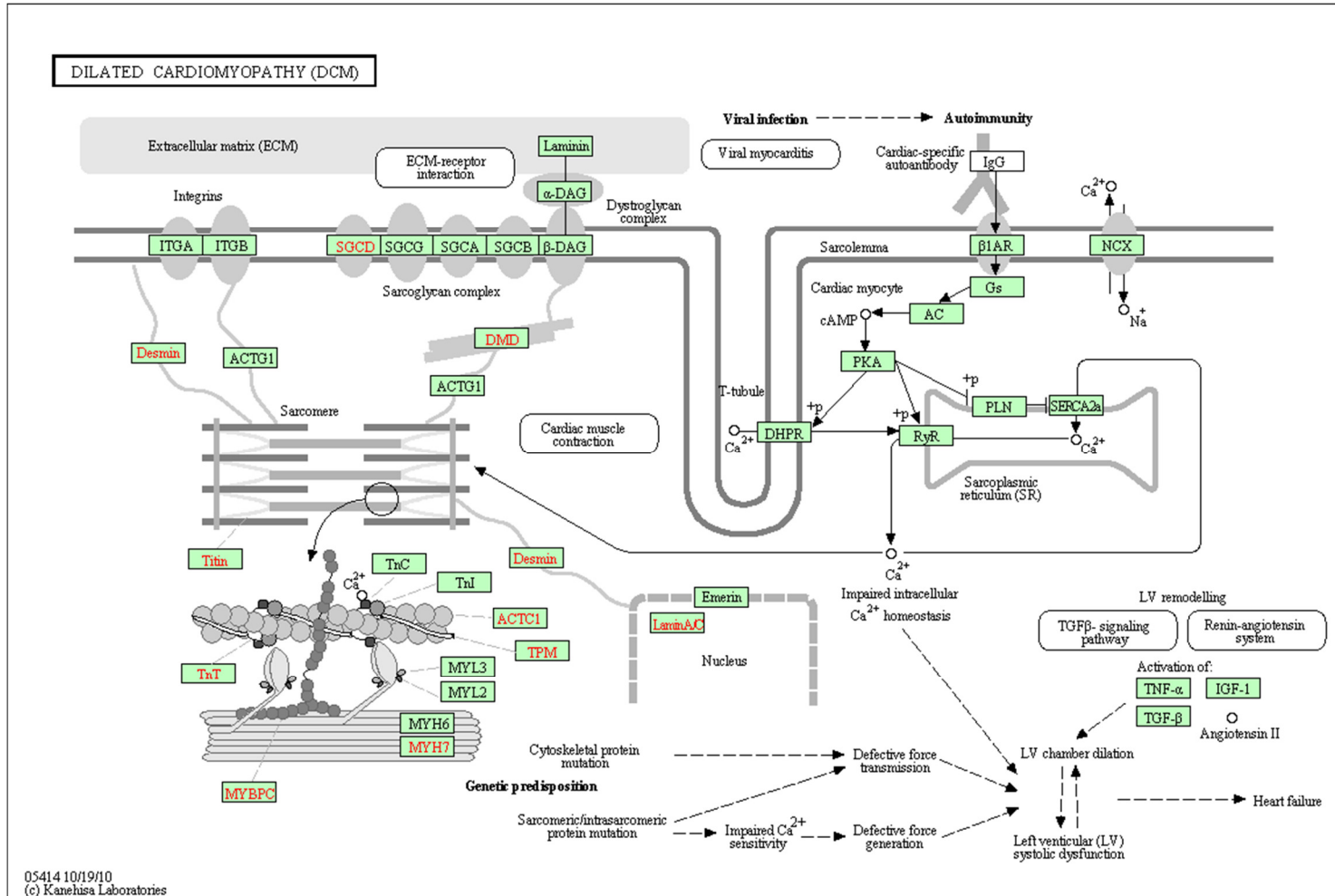
Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Metabolismo de purinas	NT5M	Homo sapiens 5',3'-nucleotidase, mitochondrial	2.18
	NT5C1A	Homo sapiens 5'-nucleotidase, cytosolic IA	3.26
	NT5E	Homo sapiens 5'-nucleotidase, ecto (CD73)	-2.04
	IMPDH2	Homo sapiens IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2	-2.06
	ADCY2	Homo sapiens adenylate cyclase 2	3.00
	ADCY4	Homo sapiens adenylate cyclase 4	2.61
	AK1	Homo sapiens adenylate kinase 1	5.70
	AK5	Homo sapiens adenylate kinase 1	2.61
	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	2.35
	ENTPD5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	2.30
	FHIT	Homo sapiens fragile histidine triad gene	-2.23
	GMPR	Homo sapiens guanosine monophosphate reductase	4.20
	GUK1	Homo sapiens guanylate kinase 1	2.95
	PDE1A	Homo sapiens phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	2.50
	PDE2A	Homo sapiens phosphodiesterase 2A, calmodulin-dependent	2.05
	PDE4A	Homo sapiens phosphodiesterase 4A, calmodulin-dependent	2.30
	PDE4C	Homo sapiens phosphodiesterase 4C	2.02

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

	PDE9A	Homo sapiens phosphodiesterase 9A	-2.81
	PFAS	Homo sapiens phosphoribosylformylglycinamide synthase	-2.88
	POLR1D	Homo sapiens polymerase (ARNM) I polypeptide D, 16kDa	2.31
	POLR1E	Homo sapiens polymerase (ARNM) I polypeptide E, 53kDa	-2.04
	POLR2F	polymerase (ARNM) II (DNA directed) polypeptide F	3.85
	POLR2H	polymerase (ARNM) II (DNA directed) polypeptide H	4.17
	PKLR	Homo sapiens pyruvate kinase, liver and RBC	2.58

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Figura 37: Ruta de la miocardiopatía dilatada



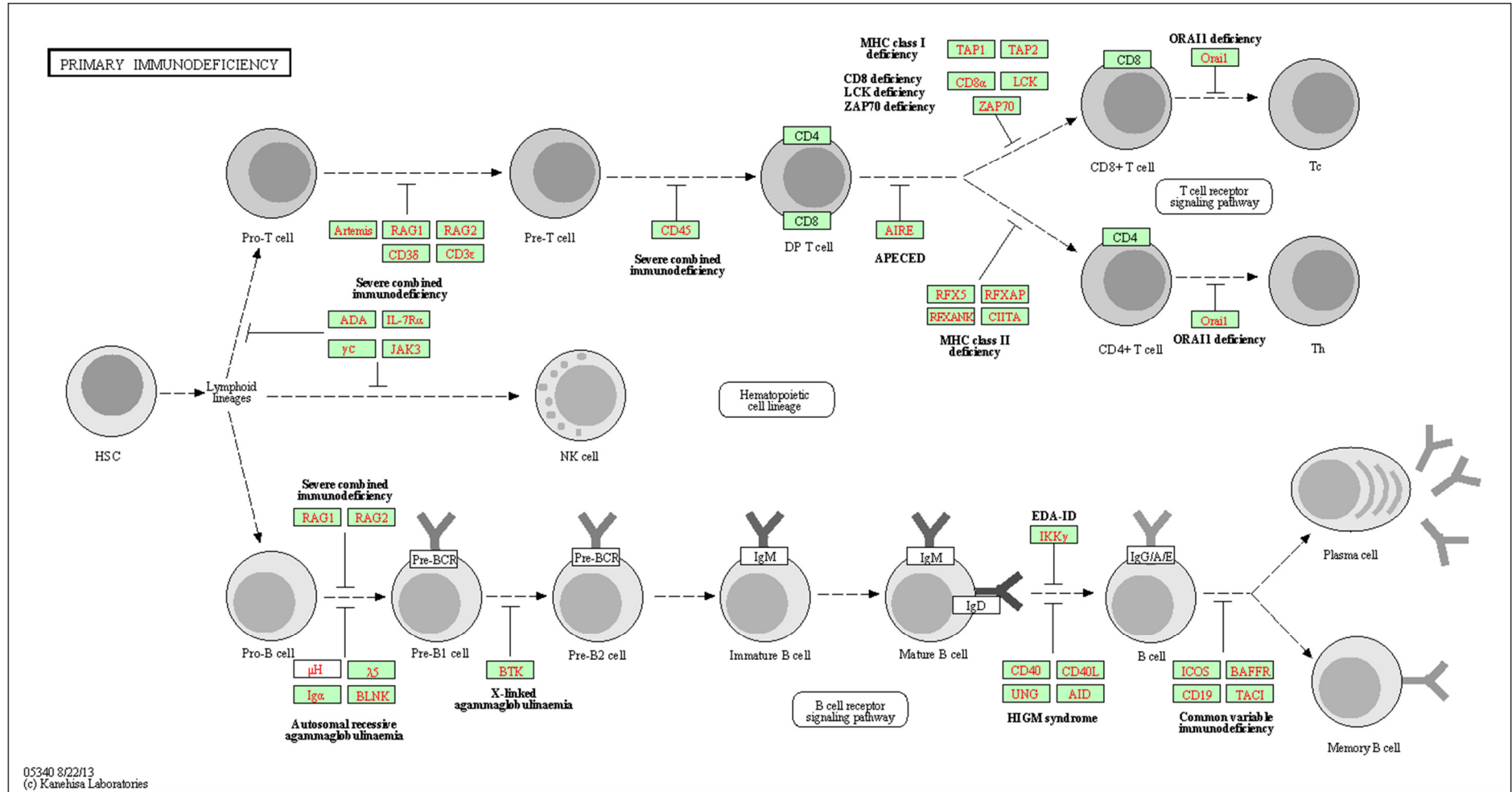
RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 22: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados la miocardiopatía dilatada.

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Miocardiopatía dilatada	GNAS	GNAS complex locus	-2.12
	ADCY2	Homo sapiens adenylate cyclase 2	3.00
	ADCY4	Homo sapiens adenylate cyclase 4	2.61
	CACNA1S	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit	2.00
	CACNB4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	-2.45
	CACNG4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	2.03
	CACNG5	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5	3.07
	CACNG6	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	-2.09
	CACNG8	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8	2.84
	DES	Homo sapiens desmin	2.91
	DMD	Homo sapiens dystrophin	3.03
	ITGA6	Homo sapiens integrin, alpha 6	-2.53
	ITGA9	Homo sapiens integrin, alpha 9	2.09
	SLC8A1	Homo sapiens solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger)	3.03
	TPM1	Homo sapiens tropomyosin 1	3.01
	TPM2	Homo sapiens tropomyosin 2	-2.30
	LMNA	Homo sapiens lamin A/C	4.55
	TTN	Homo sapiens titin	-2.43

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Figura 38: Ruta de la inmunodeficiencia primaria



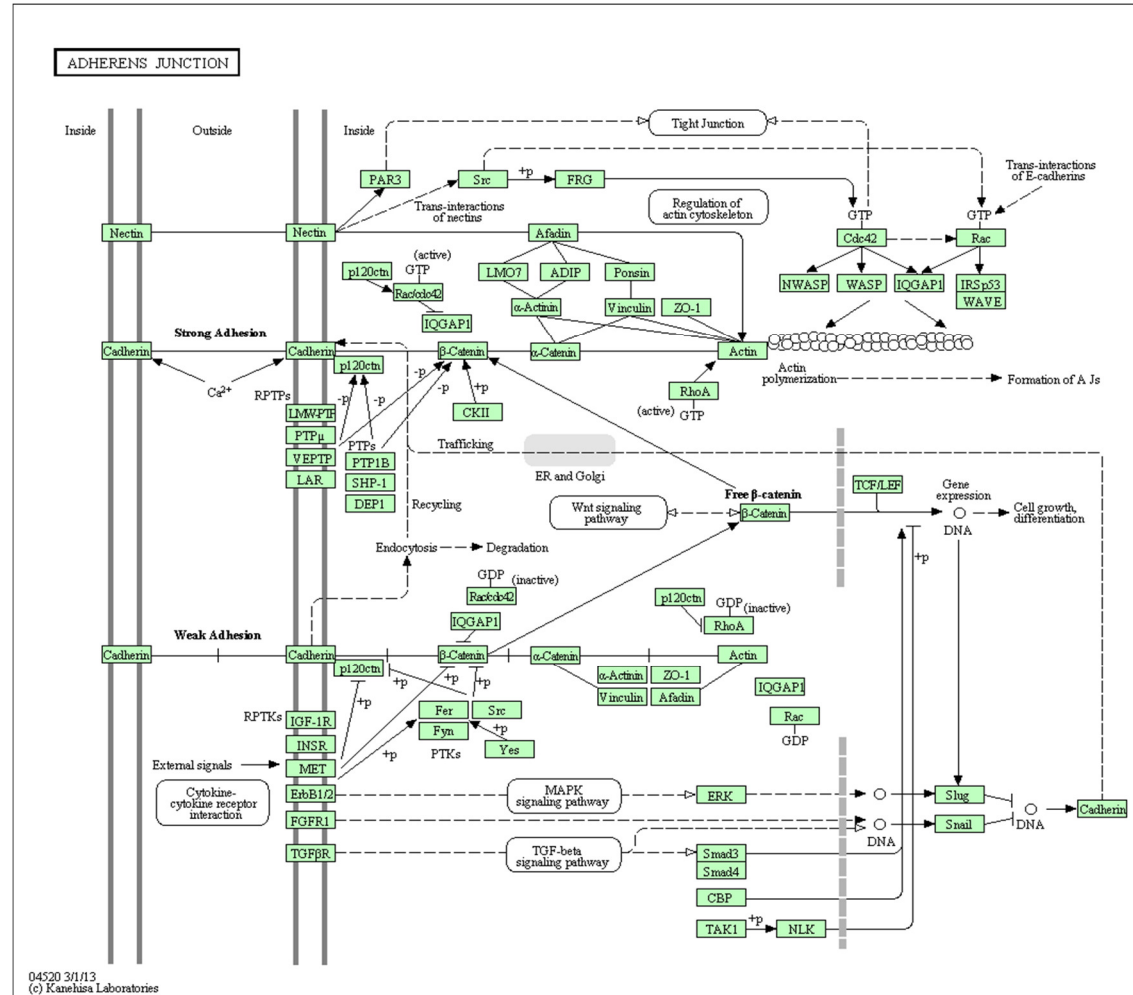
RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 23: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados la inmunodeficiencia primaria.

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Inmunodeficiencia primaria	CD4	Homo sapiens CD4 molecule	2.71
	CD40L	Homo sapiens CD40 ligand	-2.37
	CD79A	Homo sapiens CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	2.95
	CD8A	Homo sapiens CD8a molecule	-2.66
	CD8B	Homo sapiens CD8b molecule	-2.70
	JAK3	Homo sapiens Janus kinase 3	2.02
	IL7R	Homo sapiens interleukin 7 receptor	-2.20
	TNFRSF13B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B	-2.09
	ZAP70	Homo sapiens zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa	-2.15

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Figura 39: Ruta de las uniones de adherencia



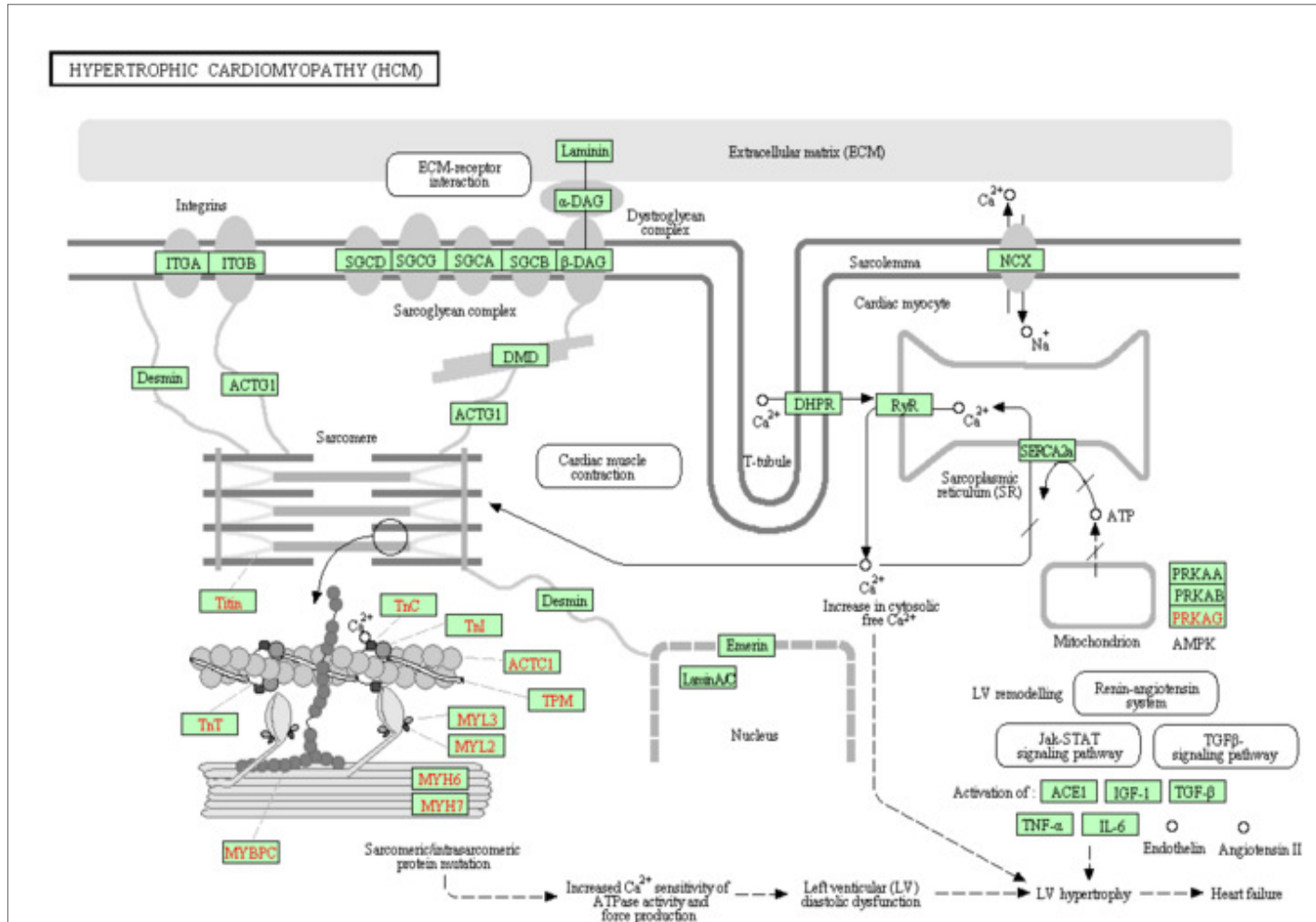
RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 24: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados las uniones de adherencia

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Uniones de adherencia	BAIAP2	Homo sapiens BAI1-associated protein 2	-2.19
	LIMO7	Homo sapiens LIM domain 7	-2.22
	WASF1	Homo sapiens WAS protein family, member 1	2.46
	ACP1	Homo sapiens acid phosphatase 1	-2.27
	ACVR1C	Homo sapiens activin A receptor, type IC	-2.18
	FGF1	Homo sapiens fibroblast growth factor 1	2.62
	LEF1	Homo sapiens lymphoid enhancer-binding factor 1	-2.74
	PAR3	Homo sapiens par-3 partitioning defective 3 homolog	-2.01
	PVRL1	Homo sapiens poliovirus receptor-related 1	2.72
	PTPRF	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	2.58
	RHOA	Ras homolog gene family, member A	2.06
	RAC	Homo sapiens cDNA, weakly similar to RAS-RELATED C3 BOTULINUM TOXIN SUBSTRATE 2.	2.11
	TCF7	Homo sapiens transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	-2.43
	SRC	Homo sapiens v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog	2.22

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Figura 40: Ruta de la miocardiopatía hipertrófica



RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Tabla 25: Niveles de expresión relativa de los genes relacionados con la miocardiopatía hipertrófica

Ruta de señalización	Símbolo del gen	Nombre del gen	Valor de cambio (Fold Change)
Miocardiopatía hipertrófica	ACE	Homo sapiens angiotensin I converting enzyme	3.46
	CACNA1S	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit	2.00
	CACNB4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	-2.45
	CACNG4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	2.03
	CACNG5	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5	3.07
	CACNG6	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	-2.09
	CACNG8	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8	2.84
	DES	Homo sapiens desmin	2.91
	DMD	Homo sapiens dystrophin	3.03
	ITGA6	Homo sapiens integrin, alpha 6	-2.53
	ITGA9	Homo sapiens integrin, alpha 9	2.09
	SLC8A1	Homo sapiens solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger)	3.03
	TPM1	Homo sapiens tropomyosin 1	3.01
	TPM2	Homo sapiens tropomyosin 2	-2.30
	LMNA	Homo sapiens lamin A/C	4.55
	TTN	Homo sapiens titin	-2.43

Discusión

Discusión

Nuestro estudio demuestra que la cirrosis genera un gran impacto a nivel sistémico, poniendo de manifiesto la existencia de un programa de transcripción activo en leucocitos de sangre periférica, caracterizado por una respuesta enriquecida en transcritos asociados a fibrogénesis. Sin embargo, las rutas moleculares concretas implicadas en la enfermedad hepática no están aún bien caracterizadas. Por ello, es necesario profundizar en los factores que influyen en los mecanismos patogénicos, así como en la progresión de la enfermedad.

La existencia de técnicas de análisis masivo de información biológica, tales como el análisis de perfiles de expresión génica por microarrays, permiten obtener una gran cantidad de información de forma simultánea sobre la respuesta del hígado cirrótico y las rutas de señalización intracelular que se alteran en esta entidad. En este sentido, la Biología de Sistemas puede ser de gran ayuda. Esta disciplina integra la información procedente de distintos campos del conocimiento para construir modelos complejos explicativos de la enfermedad.

1. Estudio de los factores clínicos asociados a la cirrosis terminal

Los datos presentados en este estudio ponen de manifiesto que la enfermedad hepática avanzada, dado que es una enfermedad de evolución crónica, se focaliza en un segmento de edad que abarca desde la cuarta a la séptima década de la vida, ocurriendo el 87% de los casos en pacientes mayores de 50 años. En cuanto a la distribución por sexo de la población estudiada, el porcentaje de varones afectados de cirrosis terminal ha sido claramente superior (70%), lo que concuerda con otros estudios (81, 82). Por tanto, el sexo y la edad avanzada parecen ser factores de riesgo diferenciales en cuanto a probabilidad de padecer esta enfermedad.

Factores de riesgo

Aproximadamente el 50% de los pacientes presentaron alguna patología médica previa del tipo Diabetes Mellitus tipo 2 (DM-II). De hecho, existen estudios que la identifican como un factor de riesgo para la progresión a enfermedad hepática, independientemente del consumo de alcohol y la presencia de ciertas infecciones víricas (83, 84, 85). Por otro lado, se sabe que el virus de la hepatitis C se asocia a una mayor tasa de diabetes debido a su efecto sobre el páncreas, contribuyendo también a la alta tasa de diabetes encontrada en esta población.

Parámetros de laboratorio

Los pacientes incluidos en este trabajo se caracterizaron por la presencia de plaquetopenia, hipoalbuminemia, así como por niveles elevados de glucosa, Proteína C Reactiva, ácido úrico y enzimas hepáticas, obteniéndose resultados similares en numerosas series de pacientes cirróticos (86, 87).

En este estudio, la elevación de las diversas enzimas hepáticas: Aspartato amino-transferasa (AST), ALT (Alanina amino-transferasa), Gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) y Fosfatasa Alcalina (ALP) coincide con los hallazgos descritos en otros estudios (88). Por un lado, AST y ALT son enzimas intracelulares que catalizan reacciones de transaminación reversibles de los alfa-aminoácidos y se liberan a circulación en grandes cantidades cuando hay daño en la membrana del hepatocito. En el caso de ALT, está presente a concentraciones más bajas en el músculo esquelético y riñón respecto a AST. Por eso, presenta mayor especificidad respecto a esta última cuando hay daño hepatocelular (10, 89, 90).

En cuanto a la Gamma-glutamyl transpeptidasa, se encarga de catalizar la transferencia del grupo γ -glutamyl desde determinados péptidos a otros aminoácidos. Por su parte, la fosfatasa alcalina se halla presente en la superficie del epitelio biliar. Ambas son enzimas que se incrementan en situaciones de colestasis (89).

Al estratificar a estos pacientes en función de la presencia o no de hepatocarcinoma se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en una serie de parámetros de laboratorio: Tiempo de Protrombina, INR, albúmina y bilirrubina.

Existen publicaciones al respecto en las que se obtienen resultados similares

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

(9, 88). Puesto que se trata de pacientes habitualmente en estadios de enfermedad menos avanzados que aquellos que tienen indicación de trasplante por cirrosis avanzada. En estos últimos, la bilirrubina, el INR y la albúmina presentan valores peores respecto a los pacientes a los que se trasplanta por hepatocarcinoma.

La alteración de las pruebas de coagulación es característica de las enfermedades hepáticas, debido fundamentalmente a la producción insuficiente de proteínas de la coagulación. El Tiempo de Protrombina evalúa la vía intrínseca de la coagulación detectando deficiencias de factores de coagulación II, V, VII, X y fibrinógeno.

La albúmina, por su parte, junto con el tiempo de protrombina son consideradas “pruebas de función hepática”, básicamente por la disminución tanto de la síntesis de factores de la coagulación como de albúmina en presencia de enfermedad hepática (88). Sin embargo, ninguna de estas pruebas es específica de la enfermedad hepática, ya que, en el caso de la albúmina su síntesis también puede verse disminuida en pacientes con síndrome nefrótico, síndrome de malabsorción o malnutrición.

La bilirrubina es el producto del catabolismo de la hemoglobina por parte del Sistema reticuloendotelial. Su elevación en este caso es indicativa de la pérdida de la capacidad excretora del hígado cirrótico.

En definitiva, el hecho de que los pacientes sin hepatocarcinoma sometidos a trasplante hepático presentasen diferencias estadísticamente significativas respecto a los que padecían hepatocarcinoma en estos parámetros (puntuación MELD, Bilirrubina, Albúmina y pruebas de coagulación) es indicativo de su peor situación clínica.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Del mismo modo, se procedió a una estratificación en función de la presencia o no de rechazo leve: en esta ocasión, los parámetros de laboratorio pretrasplante que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos subgrupos fueron de nuevo la puntuación MELD y la bilirrubina total, además del porcentaje de neutrófilos. En los pacientes con rechazo agudo leve la elevación de la bilirrubina total fue mayor que en los que no presentan rechazo. Por otra parte, la respuesta inmunitaria contra el órgano trasplantado corre a cargo de los linfocitos T. En el subgrupo de pacientes que presentan rechazo agudo leve el porcentaje de neutrófilos ha sido significativamente menor. Aunque este aspecto no se ha analizado, podría ocurrir que la población de linfocitos T en estos pacientes fuera mayor y, por tanto, su capacidad para reaccionar frente al órgano trasplantado es mayor.

En conclusión, la huella bioquímica presente en los pacientes cirróticos terminales se caracterizó por una combinación de plaquetopenia, niveles bajos de albúmina y elevados de glucosa, ácido úrico, PCR, AST, ALT, GGT y ALP.

2. Estudio de la huella molecular en el paciente cirrótico terminal

Rutas implicadas en fibrogénesis hepática

Con objeto de identificar las huellas de expresión génica asociadas a la cirrosis terminal, se realizaron microarrays de transcriptoma humano completo sobre ARNm de células de sangre periférica. Como ya se comentó en la introducción, el estudio de los perfiles de expresión génica en sangre periférica ha demostrado ser una forma útil de entender los procesos patológicos que ocurren en los distintos órganos y sistemas (91).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

En este apartado se exponen las huellas moleculares más importantes y su posible implicación fisiopatológica asociada a la cirrosis terminal, independientemente de cuál sea la causa que la origine.

Una de las rutas más destacadas en KEGG fue “Moléculas de Adhesión Celular”. La mayoría de los genes constituyentes de esta ruta se encuentran sobreexpresados en nuestros resultados, llevando a la conclusión de que los leucocitos de pacientes cirróticos no solo se activan para mediar en el proceso de fibrogénesis, sino que, además, tienen capacidad para salir del torrente sanguíneo e interactuar con componentes de la matriz extracelular.

De igual modo, los pacientes de nuestro estudio presentaron una marcada activación de la ruta “Interacción receptor-matriz extracelular” (aparece en tercer lugar). La matriz extracelular se compone de una compleja red de macromoléculas estructurales y funcionales y tiene un importante papel en la morfogénesis de tejidos y órganos además de desempeñar funciones estructurales. De hecho, cambios en su estructura como consecuencia de la activación de las Células Hepáticas Estrelladas dan lugar a su acumulación e inicio de la fibrosis (92).

Nuestros pacientes presentan, en concreto, una producción incrementada de tres proteínas de tipo heparán-sulfato pertenecientes a esta ruta: Agrina (AGRN), proteoglicano heparán-sulfato 2 (HSPG2) y Sindecano-4 (SDC-4). Las cadenas de heparán-sulfato, glicosaminoglicanos altamente sulfatados unidos al núcleo proteico de proteoglicanos tipo heparán-sulfato, están implicadas en una amplia variedad de procesos fisiológicos tales como morfogénesis, cicatrización de heridas, crecimiento y

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

diferenciación celular e interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (92). Cuando las Células Hepáticas Estrelladas se activan y se transforman en miofibroblastos, éstos comienzan a producir grandes cantidades de proteínas, entre las que se encuentran diversos tipos de colágeno, laminina, fibronectina y heparán-sulfato (72). Se ha visto como se produce una acumulación de éstos últimos en la matriz extracelular en los procesos de expansión de tejido cicatricial en diversas enfermedades hepáticas crónicas (92).

Además, existen estudios que han propuesto la acumulación de Agrina en el hígado de pacientes cirróticos como fenómeno crucial en procesos neoangiogénicos y colaborador en la proliferación de conductos biliares (93). SCD-4 podría actuar como sensor de tensión en la matriz extracelular, desempeñando funciones en la contracción de heridas, interacciones tumor-estroma, fibrosis y regulación de la motilidad (94). De hecho, en ratones, el bloqueo de SCD-4 protege frente a fibrosis túbulointersticial en el riñón (95).

Por otra parte, en nuestra cohorte de pacientes tuvo lugar la expresión de Trombospondina 1 (THBS1) y de tres genes de Laminina (LAMC3, LAMA3/LAMA4 y LAMB1) pertenecientes a esta ruta. En relación con ello, se han descrito niveles elevados de Trombospondina 1 en el suero de pacientes con fibrosis hepática (96, 97). De hecho, la Laminina está considerada un importante biomarcador sérico de fibrosis hepática (98). Asimismo, nuestros pacientes presentaron incremento en la expresión de Tenascina XB (TNXB). Las tenascinas constituyen una familia de proteínas pertenecientes a la matriz extracelular, que actúan modulando la interacción entre células con otros componentes de la matriz y factores de crecimiento. Tenascina X

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

modula la activación del TGF- β , sugiriendo este hecho un papel crucial de estas proteínas en el desarrollo de fibrosis (99). Los niveles séricos de Tenascina X actuarían como indicadores de inflamación y fibrogénesis (40).

De igual modo, los pacientes con fibrosis presentan un incremento de la expresión en sangre periférica de ocho genes que codifican diferentes tipos de colágeno: COL4A6, COL5A1, COL11A2, COL12A1, COL27A1, COL28A1, COL23A1 y COL14A1. Aunque existen otros tres genes (COL4A4, COL6A2 y COL5A3) infraexpresados en estos pacientes, nuestros resultados ponen de manifiesto que los leucocitos de sangre periférica de estos pacientes son propensos a producir colágeno. Los genes que codifican para diferentes tipos de colágeno están implicados en la activación de las Células Hepáticas Estrelladas.

Existen, además, otros genes que codifican para moléculas que de igual modo activan a estas células, como: Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos 1 (CSF1), Endotelina (EDN1), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF1), Factor de Crecimiento Tipo Insulina (IGF2), Linfotoxina alfa (LTA), Antígeno Linfocitario 96 (LY96), Cadena pesada de Miosina 14 (MYH14), Miosina, Cadena ligera de Miosina 4 (MYL4), entre otros. En el hígado, la activación de las Células Hepáticas Estrelladas da lugar a la deposición de colágeno iniciando la fibrogénesis hepática (8, 40). IGF2 (Somatomedina A) estimula, además, la proliferación de hepatocitos (100).

El Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos es la principal citoquina encargada de controlar el desarrollo y la función de los neutrófilos (101). Por tanto, el

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

G-CSF podría mediar la excesiva migración y reclutamiento de neutrófilos al hígado, contribuyendo así al aumento de la inflamación en estos pacientes.

La ruta de señalización del TGF- β es una de las principales rutas activadas en la cohorte de pacientes cirróticos. Existe sobreexpresión de una serie de componentes de esta ruta como: Factor de crecimiento y diferenciación tipo 7 (GDF7), Inhibina Beta C (INHBC), Miembro A homólogo de la familia Ras (RHOA), Proteína de unión al Factor de Crecimiento Transformante tipo β (LTBP1), miembro de la familia SMAD tipo 5 (SMAD5), miembro de la familia SMAD tipo 9 (SMAD9), Factor tipo Retinoblastoma 1 (RBL1), Factor de transcripción Dp-1 (TFDP1), THBS1, factor de crecimiento y diferenciación tipo 5 (GDF5), Inhibina Beta E (INHBE), CHRD y Ubiquitina protein-ligasa E3 (RBX1). La activación de dicha ruta constituye uno de los estímulos más importantes para la matriz extracelular a nivel sistémico y también a nivel hepático (102).

Por otra parte, los hepatocitos son la principal fuente de metaloproteinasas (MMPs), endopeptidasas dependientes de Zinc que desempeñan diversas funciones, principalmente degradación de matriz extracelular. En nuestro estudio, existe un incremento en la expresión de dos tipos de metaloproteinasas: MMP-19 y MMP-28. La transcripción de las MMPs es inducida por citoquinas inflamatorias como IL-1, TNF α y factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) y Factor de Crecimiento de Fibroblastos (TGF- β 1); por tanto, tienen un papel preponderante en la inflamación crónica (103). De igual modo, se ha visto como las MMPs participan en el desarrollo de microambientes óptimos para el desarrollo de tumores (104). En el último estadio fibrótico de la cirrosis, los

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

activadas, producen IL-6, que de forma autocrina aumenta la expresión de TGF- β 1, de manera que se convierten en una fuente importante de TGF- β 1 y el tipo celular que más contribuye al acúmulo de productos de matriz extracelular durante el daño hepático (107).

Del mismo modo, se ha hallado un incremento en la expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2 en sangre en nuestra cohorte de pacientes. Yokomori *et al* recientemente han relacionado a la primera de ellas (localizada en las células endoteliales de los sinusoides hepáticos) con la progresión a cirrosis (108). También se ha visto su implicación en la angiogénesis de los sinusoides hepáticos y remodelado durante la progresión a cirrosis (108).

Rutas relacionadas con alteraciones en el metaboloma

Del total de rutas destacadas, la del metabolismo de Glicina, Serina y Treonina aparece en primer lugar. De los genes que componen la ruta, siete se encuentran diferencialmente expresados en nuestro análisis, cinco sobreexpresados: ALAS2 (Aminolevulinato-delta-sintasa 2), C20orf62 (región de lectura abierta 62 del cromosoma 20), GCAT (Glicina C-Acetiltransferasa), PIPOX (Ácido pipercolico oxidasa) y SDS (Serina deshidratasa) y dos infraexpresados: GATM (Glicina amidinotransferasa) y PH6DH (Fosfoglicerato deshidrogenasa).

Continuando con rutas de aminoácidos, la ruta del metabolismo de Fenilalanina aparece en cuarto lugar. Los genes que componen la ruta sobreexpresados en pacientes cirróticos son: HPD (4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa), ALDH3B1, ALDH3A1 (Aldehído

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

deshidrogenasa 3), AOC2 (Amino oxidasa), MAO-A y MAO-B (Monoaminoxidasas A y B), PRDX6 (Peroxiredoxina 6), TAT (Tirosina aminotransferasa). En quinto lugar, se halla la ruta del metabolismo de Tirosina, en la que encontramos sobreexpresados los genes: HPD ALDH3B1, ALDH3A1, AOC2, MAO-A y MAO-B, TAT (comunes a ambas rutas) y TH (Tirosina hidroxilasa) y genes infraexpresados: HEMK1 (HemK-metiltransferasa), DDTL (tautomerasa), HGD (Homogentisato 1,2- dioxigenasa) y PNMT (Feniletanolamina N-metiltransferasa).

Es conocida la relación existente entre la gravedad de la fibrosis hepática y alteraciones en el metaboloma: Existen estudios donde se ha observado acumulación de fenilalanina en estadios terminales de enfermedad hepática, con disminución de la hidroxilación y conversión a tirosina (109, 110). En nuestro caso, el hecho de que la expresión de una enzima clave de este proceso como es la Tirosina hidroxilasa esté incrementada puede representar un mecanismo que trate de contrarrestar la acumulación excesiva de fenilalanina en estos pacientes. En otros casos, a partir de muestras de biopsias hepáticas, se ha analizado la composición de aminoácidos de microsomas y mitocondrias hepáticas, detectándose variaciones entre pacientes cirróticos y con ictericia obstructiva frente a controles sanos (111). En concreto, destaca el incremento en la acumulación de fenilalanina, metionina y serina. Estos cambios en la proporción de aminoácidos son indicativos de la alteración en la síntesis proteica que tiene lugar durante el curso de la enfermedad hepática. Además, el hecho de que, tal y como sucede en nuestro estudio, se produzca a nivel sistémico, es un fiel reflejo del papel que desempeña el hígado en la fisiología humana como centro metabólico.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Por lo que respecta al metabolismo de lípidos, se ha visto como la producción de Tromboxano A2 por parte de las células endoteliales sinusoidales hepáticas aumenta la resistencia portal, incrementando el grado de hipertensión portal propio de estos pacientes (112). Nuestros resultados concuerdan en este sentido, puesto que existe sobreexpresión del gen que codifica para el receptor del Tromboxano A2 (TBXA2R).

En cuanto a la ruta del metabolismo de las purinas, lo más destacable es el aumento en la expresión de genes que codifican la enzima adenilato ciclasa (ADCY2 y ADCY4), adenilato quinasa (AK1 y AK5), fosfodiesterasas (PDE1A, PDE2A, PDE4A, PDE4C) y polimerasas de ARN (POLR1D, POLR2F y POLR2H).

La enzima Adenilato Ciclasa forma parte de la cascada de señalización de la proteína G: se encarga de convertir el ATP en AMP cíclico y pirofosfato. Se ha visto como esta enzima presenta un comportamiento anómalo en los hepatocitos de pacientes con cirrosis terminal (113), dando lugar a diversas alteraciones metabólicas en estos pacientes, fundamentalmente falta de respuesta a glucagón. Otros ensayos, sin embargo, demuestran como el AMP cíclico (producto de su activación) inhibe el crecimiento de las HSC (114) dando a entender que la activación de la adenilciclasa contrarresta el desarrollo de fibrosis. De hecho, la pentoxifilina, es utilizada como agente antifibrótico en pacientes cirróticos por su capacidad para aumentar el AMP cíclico inhibiendo en este caso a la fosfodiesterasa. Tanto la adenilato ciclasa como la fosfodiesterasa se encuentran sobreexpresadas en nuestro análisis.

En base a estos hallazgos, nuestro trabajo demuestra que la cirrosis induce una activación de firmas transcriptómicas implicadas en diversos procesos metabólicos,

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

como se pone de manifiesto en las alteraciones observadas en rutas que forman parte del metabolismo de aminoácidos, nucleótidos y ácido araquidónico.

Rutas relacionadas con cirrosis hepática y enfermedad cardíaca

En nuestro análisis destaca la presencia de una serie de rutas relacionadas con alteraciones cardíacas. Estas rutas son esencialmente: Contracción del músculo cardíaco, miocardiopatía dilatada y miocardiopatía hipertrófica.

Una de las complicaciones más conocidas en pacientes cirróticos es la miocardiopatía cirrótica: ésta se caracteriza por deterioro de la capacidad de contractilidad, disfunción diastólica y anormalidades electrocardiográficas (aumento del intervalo QT) en ausencia de enfermedad cardíaca (115). Los mecanismos que originan este cuadro incluyen: cambios en la fluidez de la membrana de los cardiomiocitos, fibrosis, hipertrofia miocárdica y alteraciones a nivel de canales iónicos (116). Durante el curso de la enfermedad, la propia progresión de la enfermedad hepática y la hipertensión portal dan lugar a una vasodilatación progresiva, reduciendo el volumen arterial efectivo y dando lugar a la activación del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona a nivel del Sistema Nervioso Central. La inflamación juega un papel esencial en la patogénesis de la disfunción cardíaca, especialmente en la cirrosis descompensada (116). Una de las rutas destacadas en nuestro análisis “Miocardiopatía hipertrófica” muestra sobreexpresión de la enzima convertidora de Angiotensina (ECA), concordando con lo descrito en la bibliografía.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Entre las alteraciones a nivel de membrana se encuentran los cambios a nivel de ATPasa y canales de calcio. Dichas alteraciones parecen ser las responsables de los cambios electrocardiográficos que se producen en pacientes cirróticos (115). En nuestro caso, en las tres rutas aparecen alteraciones a nivel de canales de calcio, en concreto en los canales de calcio - CACNA1S, CACNG4, CACNG5, CACNG8 sobreexpresados- y CACNB4 y CACNG6 infraexpresados. En cuanto a alteraciones a nivel de ATPasas, tienen lugar en la ruta “Contracción del músculo cardíaco” con sobreexpresión de ATP1B2 y ATP1A3.

Otras rutas destacadas en el análisis

Otra ruta que aparece destacada en nuestra comparación es la que hace referencia a los transportadores ABC: se trata de proteínas transmembrana pertenecientes a una superfamilia de proteínas (117). Utilizan energía obtenida a partir de ATP (adenosin-trifosfato) para llevar a cabo procesos tales como transporte activo de sustratos (lípidos, esteroides, fármacos) entre membranas y otros procesos no relacionados con el transporte como reparación de ADN, síntesis proteica, fibrosis quística y multirresistencia a fármacos (118). Estudios previos realizados en este caso con biopsias hepáticas y validados mediante PCR a tiempo real especulan con la posibilidad de que estas proteínas se pudiesen utilizar como marcadores precoces e incluso dianas terapéuticas en pacientes con hepatocarcinoma (en nuestra cohorte, hay 11 pacientes con hepatocarcinoma). De hecho, una de estas proteínas de transmembrana, ABCC3, podría resultar útil en el diagnóstico tanto de cirrosis como de

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

hepatocarcinoma, puesto que se observó un aumento en su expresión en la membrana plasmática de los hepatocitos de pacientes cirróticos (119, 120) especialmente aquellos que habían desarrollado esta neoplasia.

En nuestra ruta de transportadores ABC no se encuentra sobreexpresado ABCC3, en cambio, si lo están otros de estructura y función esencialmente similar: ABCC13 (Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 13, pseudogene, transcript variant D), ABCD4 (Homo sapiens cDNA FLJ43119 fis, clone CTONG3003179), ABCC10 (Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10 (ABCC10), transcript variant MRP7A), ABCA2 (Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family A, member 2), ABCC4 (Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4), ABCG2 (Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2), ABCA1 (Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family A, member 1), ABCC6 (Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6, transcript variant 2), ABCC5 (Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5, transcript variant 2) y ABCC8 (Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8).

En la ruta denominada “Inmunodeficiencia primaria”, uno de los genes sobreexpresados en esta ruta es el CD79A. En relación con ello, existen estudios en los que la administración de un anticuerpo monoclonal anti CD79 en ratones provoca una exacerbación de la enfermedad hepática (121). De ahí que se atribuya a esta molécula la función de disminuir la respuesta inflamatoria mediada por citoquinas.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Por otra parte, se ha visto como pacientes cirróticos presentan un incremento de la ratio CD4/CD8 (122). En nuestra comparación, el gen que codifica para CD4 está sobreexpresado mientras que aquel que codifica para el CD8 se halla infraexpresado.

En pacientes con inmunodeficiencias primarias, infecciones, procesos inflamatorios, esplenomegalia, el incremento del flujo venoso unido a alteraciones en la población linfocitaria contribuyen a incrementar el daño hepático y la aparición de hipertensión portal (123).

Por lo que respecta a la ruta “Uniones de adherencia”, existen estudios realizados en biopsias hepáticas de ratas a las que se ha inducido una cirrosis en los que se ha visto que existe sobreexpresión, entre otros, de genes que codifican para proteínas implicadas en uniones de adherencia. En concreto, Tugues *et al.* identificaron cuatro genes que codificaban para cuatro proteínas de adherencia: CDH1, CDH2, CLDN3 y CLDN5 cuya expresión estaba incrementada (124) en ratas a las que se había inducido cirrosis mediante la administración de tetracloruro de carbono. Estas proteínas participarían en el transporte bidireccional de moléculas entre células endoteliales y hepatocitos, contribuyendo activamente al desarrollo de fibrosis en los sinusoides hepáticos.

A pesar de que el número de trabajos sobre perfiles de expresión génica en sangre periférica de pacientes con enfermedades hepáticas es limitado, existen algunos artículos al respecto. Shi M *et al* relacionaron la sobreexpresión de tres genes concretos con la aparición temprana de carcinoma hepatocelular (125): dominio CXC de quimiocinas, receptor 2 de quimiocinas (CXCR2) y el fragmento E1A de unión a la

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

proteína EP400. Hemos buscado una firma transcriptómica similar en nuestro estudio, pero no la hemos encontrado ni en la comparación general ni en el subgrupo de pacientes con hepatocarcinoma. Probablemente, la razón radique en las características de ambos trabajos: el estudio de Shi *et al* utilizó ARN de células mononucleares periféricas (PBMCs), en cambio nuestro estudio emplea ARN obtenido de sangre periférica. De este modo, en nuestro caso se consideran los genes transcritos procedentes de neutrófilos, hecho que en el caso de Shi *et al* no es así.

Expresión de Interleuquinas en pacientes cirróticos

Estudios realizados en animales y humanos ponen de manifiesto que las células endoteliales sinusoidales secretan la citoquina IL-33 y que ésta es capaz de activar a las células hepáticas estrelladas y promover la fibrosis. Por el contrario, la producción y secreción por parte de estas células de sustancias como el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular y Óxido nítrico puede promover el retorno al estadio quiescente de las células hepáticas estrelladas y prevenir la aparición de fibrosis (3).

En nuestro análisis se hallan sobreexpresadas una serie de interleuquinas que son: Interleuquina 1 (IL1), Interleuquina 10 (IL10), diversos tipos de Interleuquina 17 incluido el receptor, fundamental para su acción biológica (IL17A, IL17C, IL17E, IL17F e IL17REL), Interleuquina 27 (IL27) e Interleuquina 28 (IL28A). Por el contrario, existen interleuquinas cuya expresión está disminuida como: Receptor de Interleuquina 7 (IL7R), receptor de Interleuquina 23 (IL23R) e Interleuquina 24 (IL24).

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Estudios en ratones han demostrado que la IL-17 induce la aparición de fibrosis por medio de múltiples mecanismos, entre los cuales se encuentran la sobreexpresión de TNF- α , TGF- β 1, y Colágeno 1 α , y factores que codifican para la síntesis de miofibroblastos (126).

Otros genes sobre los que actúa IL-17 son aquellos que codifican para quimiocinas, especialmente las de clase CXC: CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CXCL10 y en menor grado las quimiocinas CC: CCL2 y la CCL20, de las cuales la primera induce la acumulación de monocitos. CCL20 es el ligando para la CCR6 el cual se expresa selectivamente en las células Th17, lo que indica que éste, es otro factor de retroalimentación positivo para la IL-17 al reclutar más células productoras de IL-17 hacia los sitios inflamados (60). En nuestro caso, los resultados coinciden en cuanto a la sobreexpresión de la Quimiocina 10 (CXCL10) pero también se halla incrementada la expresión de Quimiocina 12 (CXCL12) y se observa infraexpresión de las quimiocinas tipo 6 y 7 (CXCR6, CXCR7).

Es conocida la actividad proinflamatoria de interleuquinas como la tipo 1. En cambio, existen otras con un marcado carácter antiinflamatorio como es el caso de la Interleuquina 10 (IL10) e Interleuquina 27 (IL27), en este caso mediante la inhibición de la activación de las HSCs (60).

En el caso de la IL-10, también se ha observado incremento de su expresión en pacientes con fibrosis hepática infectados por el virus de la Hepatitis C (127). Se especula con que el papel que juega esta citoquina es el de normalizar los niveles de ALT, mejorar la histología hepática y reducir la fibrosis hepática de igual modo a través de la no

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

activación de las HSCs. En nuestra cohorte de pacientes hay 8 pacientes infectados por este virus.

Respecto al aumento en la expresión de citoquinas inmunomoduladoras: IL-10, IL-1RA y de la IL-27, podría representar un intento de prevenir el daño inflamatorio prolongado promovido por la liberación de citoquinas y quimiocinas (128).

Existen, en relación a ello, otros estudios que relacionan a la Interleuquina 27 con un efecto antagónico sobre la expresión de IL-17 (129) en infecciones del sistema nervioso central. En nuestro caso, su sobreexpresión, de nuevo, constituiría un mecanismo para frenar la sobreactivación en la expresión de los diversos tipos de IL-17, incluido el receptor de la Interleuquina 17 tipo E. En relación con ello, se ha visto como la sobreexpresión de IL-17F en los pulmones da lugar a un infiltrado inflamatorio alveolar donde predominan los neutrófilos y los macrófagos (130).

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 (131).

Otros aspectos del análisis

Una de las limitaciones de nuestro estudio fue 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. Tras el trasplante, estos pacientes son sometidos a tratamientos con inmunosupresores (a fin de evitar el rechazo en el trasplante) y la lesión de preservación que sufre el hígado donante para su conservación y traslado, hace que tanto la serie blanca como las

plaquetas disminuyan drásticamente en el postoperatorio inmediato. 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.

3. Modelo de patogénesis en la cirrosis terminal

La integración de la información clínica y el análisis del transcriptoma permiten generar un modelo de patogénesis que aporta claves importantes para entender la cirrosis terminal, independientemente de la causa que la origine.

Nuestros resultados evidencian por primera vez que la cirrosis terminal se caracteriza por la presencia de una respuesta activa profibrótica a nivel transcriptómico en sangre periférica. En este proceso es crucial la activación de las Células Hepáticas Estrelladas desde los primeros momentos de la enfermedad, como demuestra la sobreexpresión de todas aquellas moléculas que activan finalmente a estas células. Esta activación supone el comienzo de la fibrogénesis hepática, con el depósito de matriz extracelular.

La cirrosis hepática se caracteriza además por la existencia de perfiles de expresión génica característicos en sangre periférica, relacionados con alteraciones en el metaboloma y patología cardíaca. Esta huella molecular podría participar en la patogénesis de esta enfermedad y de las complicaciones extrahepáticas asociadas (aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular, miocardiopatía cirrótica, etc.). La

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

inflamación, en este sentido, influye en la patogenia de la disfunción cardiaca, especialmente en la cirrosis descompensada.

Cabe también destacar la expresión de interleuquinas promotoras de un estado proinflamatorio, principalmente IL-1, IL-10, IL-17, IL-27 e IL-28. Otras, como el gen que codifica para el receptor de la IL-7, IL-23 e IL-24 se hallan infraexpresadas.

Esta tesis demuestra el potencial de estos perfiles como biomarcadores pronóstico en la cirrosis terminal, independientemente de la causa que la origine. Estos biomarcadores podrían ser de gran ayuda en el manejo clínico de estos pacientes, sobre todo de cara a predecir la evolución a cirrosis. Por otra parte, la sangre es una muestra fácil de obtener respecto a una biopsia hepática.

Los hallazgos de esta tesis apuntan por tanto a que la cirrosis terminal sería consecuencia de una respuesta pro-fibrótica exacerbada, con potencial capacidad de causar daño inflamatorio tisular y con una clara repercusión a nivel sistémico. Monitorizar los niveles de expresión en sangre de los genes que participan en las rutas destacadas en este trabajo sería de interés a la hora de predecir/monitorizar la evolución a cirrosis y las complicaciones metabólicas asociadas. Se precisan estudios adicionales para dilucidar si los genes identificados aquí constituirían dianas terapéuticas en esta entidad.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

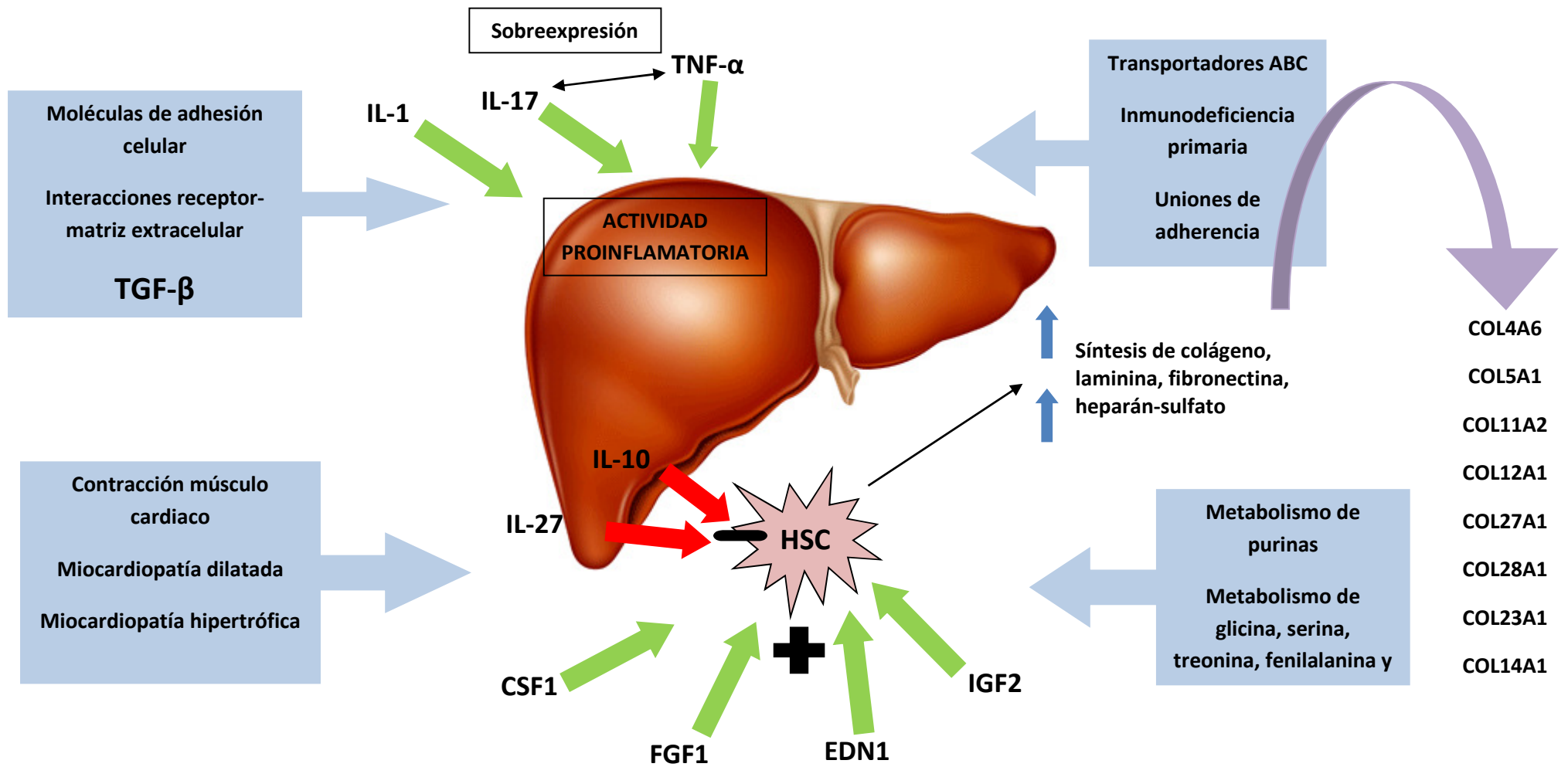


Figura 41. Modelo de patogénesis en la cirrosis

Conclusiones

Conclusiones

1. Los pacientes con cirrosis terminal muestran sobre-expresión de genes pertenecientes a rutas implicadas en fibrogénesis hepática: “Moléculas de adhesión celular”, “Interacción receptor-matriz extracelular” y “Ruta del Factor de Crecimiento Transformante tipo β ”.
2. Los pacientes con cirrosis terminal muestran sobre-expresión de genes pertenecientes a rutas relacionadas con alteraciones en el metaboloma: “Metabolismo de glicina, serina y treonina”, “Metabolismo de tirosina”, “Metabolismo de fenilalanina” y “Metabolismo de purinas”.
3. Los pacientes con cirrosis terminal muestran sobre-expresión de genes pertenecientes a rutas relacionadas con patología cardíaca: “Contracción del músculo cardíaco”, “Miocardiopatía dilatada” y “Miocardiopatía hipertrófica”.
4. Los pacientes con cirrosis terminal muestran sobre-expresión de genes pertenecientes a rutas como: “Transportadores ABC”, “Inmunodeficiencia primaria” y “Uniones de adherencia”.
5. La activación de estas rutas demuestra la existencia en la cirrosis de programas de respuesta inmune disregulada a nivel sistémico que podrían participar en los

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

procesos de fibrogénesis hepática que caracterizan a esta enfermedad, así como estar implicados en las complicaciones extrahepáticas asociadas a la misma (aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular, etc.).

6. No se encontraron perfiles de expresión génica diferenciales entre los pacientes con/sin hepatocarcinoma ni entre los que presentaron rechazo agudo respecto a los que no.
7. La huella bioquímica presente en estos pacientes se caracteriza por una combinación de plaquetopenia e hipoalbuminemia así como por niveles elevados de glucosa, Proteína C Reactiva, ácido úrico y enzimas hepáticas (GOT, GPT, GGT y PA).
8. Los pacientes con hepatocarcinoma presentaron menor puntuación MELD, menor INR, niveles más bajos de bilirrubina total y concentraciones mayores de albúmina que los pacientes sin hepatocarcinoma. Este hecho apunta a una peor situación clínica de estos últimos.
9. Los pacientes que presentaron rechazo agudo leve tras el trasplante presentaron previamente una puntuación MELD y concentración de bilirrubina total superiores junto con un porcentaje de neutrófilos menor que los pacientes que no desarrollaron este tipo de rechazo.
10. La cuantificación de los transcritos de ARNm pertenecientes a las rutas de señalización intracelular descritas en este trabajo podría tener utilidad

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

pronóstica y servir para monitorizar el riesgo de progresión a cirrosis y de desarrollar las complicaciones metabólicas asociadas a la misma.

11. Se precisan estudios adicionales para elucidar si los genes identificados aquí podrían constituir dianas terapéuticas en esta entidad.

Rendimiento científico

Artículos internacionales

Título: Evidence of Active Pro-Fibrotic Response in Blood of Patients with Cirrhosis.

Sanchez-Antolín G*, Almohalla-Alvarez C*, **Bueno P***, Almansa R*, Iglesias V, Rico L, Ortega A, Muñoz-Conejero E, García-Pajares F, Bermejo-Martin JF.

*These authors contributed equally to this work.

- **Revista:** PLoS One. 2015 Aug 28; 10(8).

- **Cuartil:** 1

- **Especialidad:** Medicina e investigación básica (multidisciplinar)

- **Índice de Impacto (JRC 2014):** 3,234

Congresos Internacionales

Título: Transcriptomic signature in cirrhotic patients in the liver trasplantation waiting list.

Bueno Requena P, Santos Santamarta F, Sánchez Ocaña R, Peñas Herrero I, Vargas García A, Muñoz Conejero E, García Pajares F, Almohalla Álvarez C, Rico L, Iglesias V, Bermejo-Martín J, Sánchez Antolín G.

ILTS 21st Annual InteARNmtional Congress, June 4-7, 2014, London, United Kingdom.

Título: Transcriptomic signature in cirrhotic patients undergoing liver transplantation.

Bueno Requena P, Amo Alonso R, Loza Vargas A, García Pajares F, Almohalla Álvarez C, Muñoz Conejero E, Almansa Mora R, Pérez Saborido B, Bermejo-Martin JF and Sánchez Antolín G.

ILTS 21st Annual InteARNmtional Congress, July 8-11, 2015, Chicago, IL-USA.

Congresos nacionales

Título: Estudio de la huella molecular en pacientes cirróticos en sangre periférica.

P. Bueno Requena, R. Moreno Mayordomo, D. Calvo Nieves, I. Vidriales Vicente, J. Valentín Cid, H. Marcos Sánchez, B. Aguirre Gervás, O. Gómez Bellver, G. Sánchez Antolín, J.F. Bermejo Martín, E. Largo Cabrerizo

IX Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, Madrid del 7 al 9 de octubre de 2015.
COMUNICACIÓN ORAL PREMIADA CON ACCÉSIT.

Título: Activación sistémica IL-15 e IL-17 en pacientes con cirrosis avanzada.

Bueno Requena P, Sánchez Ocaña R, Santos Santamarta F, Peñas Herrero I, Vargas García A, Muñoz Conejero E, García Pajares F, Almohalla Álvarez C, Rico L, Iglesias V, Bermejo-Martín JF, Sánchez Antolín G.

Congreso Sociedad Española Digestivo. Valencia, 16 de junio de 2014. COMUNICACIÓN ORAL.

Título: Utilidad de los microarrays en el estudio de la fisiopatología de la cirrosis avanzada.

P. Bueno Requena, R. Moreno Mayordomo, D. Calvo Nieves, G. Sánchez Antolín, F.J. Bermejo-Martín, O. Gómez Bellver, R. Almansa Mora, E. Largo Cabrerizo, I. Vidriales Vicente, C. Andrés Ledesma.

VIII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. Sevilla, 15-17 de octubre de 2014.
COMUNICACIÓN ORAL.


RESEARCH ARTICLE

Evidence of Active Pro-Fibrotic Response in Blood of Patients with Cirrhosis

Gloria Sanchez-Antolín^{1*}, Carolina Almohalla-Alvarez¹, Pilar Bueno², Raquel Almansa³, Verónica Iglesias³, Lucía Rico³, Alicia Ortega³, Eva Muñoz-Conejero⁴, Félix García-Pajares¹, Jesus F. Bermejo-Martín²

1 Unidad de Hepatología, Unidad de Trasplante Hepático, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, Spain, **2** Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain, **3** Investigación Médica en Infección e Inmunidad (IMI), Hospital Clínico Universitario de Valladolid- IECSCYL, Valladolid, Spain, **4** Escuela de Enfermería Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain

* These authors contributed equally to this work.
* gloriasanchez_antolin@hotmail.com


 OPEN ACCESS

Citation: Sanchez-Antolin G, Almohalla-Alvarez C, Bueno P, Almansa R, Iglesias V, Rico L, et al. (2015) Evidence of Active Pro-Fibrotic Response in Blood of Patients with Cirrhosis. PLOS ONE 10(8): e0137128. doi:10.1371/journal.pone.0137128

Editor: Melissa A. Auld, University of Navarra School of Medicine and Center for Applied Medical Research (CIMA), SPAIN

Received: May 7, 2015

Accepted: August 12, 2015

Published: August 28, 2015

Copyright: © 2015 Sanchez-Antolin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The resulting data sets were uploaded at the Array Express microarray data repository (E-MTAB-3338).

Funding: This work was supported by the Consejería de Sanidad de Castilla y León, Proyectos de la Gerencia Regional de Salud (<http://www.saludcastilyleon.es>) and the Instituto de Salud Carlos III, Spain, EMER07050 (www.isdiles.es). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

The role of systemic immunity in the pathogenesis of cirrhosis is not fully understood. Analysis of transcriptomic profiles in blood is an easy approach to obtain a wide picture of immune response at the systemic level. We studied gene expression profiles in blood from thirty cirrhotic patients and compared them against those of eight healthy volunteers. Most of our patients were male ($n = 21$, 70%) in their middle ages [57.4 ± 6.8 yr]. Alcohol abuse was the most frequent cause of cirrhosis ($n = 22$, 73%). Eleven patients had hepatocellular carcinoma (36.7%). Eight patients suffered from hepatitis C virus infection (26.7%). We found a signature constituted by 3402 genes which were differentially expressed in patients compared to controls (2802 over-expressed and 600 under-expressed). Evaluation of this signature evidenced the existence of an active pro-fibrotic transcriptomic program in the cirrhotic patients, involving the [extra-cellular matrix (ECM)-receptor interaction] & [TGF-beta signaling] pathways along with the [Cell adhesion molecules] pathway. This program coexists with alterations in pathways participating in [Glycine, serine and threonine metabolism], [Phenylalanine metabolism], [Tyrosine metabolism], [ABC transporters], [Purine metabolism], [Arachidonic acid metabolism]. In consequence, our results evidence the co-existence in blood of a genomic program mediating pro-fibrotic mechanisms and metabolic alterations in advanced cirrhosis. Monitoring expression levels of the genes involved in these programs could be of interest for predicting / monitoring cirrhosis evolution. These genes could constitute therapeutic targets in this disease.

Introduction

Intra-hepatic inflammation and immune response are known to play central roles in the pathogenesis of cirrhosis [1]. Both are direct causes of injury to hepatocytes and activation of hepatic stellate cells (HSCs), which ultimately leads to liver fibrosis [2]. In contrast, the participation of

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

the systemic immunological response in the pathogenesis of this disease has not been totally clarified. Analysis of transcriptomic profiles in peripheral blood is a widely accepted method to evaluate the complex immune networks that operate throughout the entire body. It has proven to be a valid approach for studying pathogenesis as well as to identifying potential biomarkers in a large variety of diseases [3]. While there are a number of previous works evaluating gene expression in hepatic tissue of cirrhotic patients or chronic liver diseases [4][5][6][7], there is very limited information on the transcriptomic profiles present in blood of these patients.

Our work unveils for the first time the presence of an active pro-fibrotic transcriptomic program in the blood of patients with liver cirrhosis, co-existing with alterations in the metabolome. Our findings evidence the important impact of cirrhosis on the immune response at the systemic level, providing also interesting clues on the potential roles of peripheral leukocytes in the pathogenesis of this disease.

Materials and Methods

Patients

We studied thirty cirrhotic patients of the Hepatology Unit of Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, Spain. We compared the study group with eight healthy volunteers who were in the same age range recruited from the staff of the Hospital, as control group. Approval of the study protocol for both the scientific and ethical aspects was obtained from the Scientific Committee for Clinical Research of "Hospital Universitario Río Hortega" (Comité de Ética en Investigación Clínica, CEIC-Área Oeste, Valladolid, Spain), conforming to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants before recruitment.

Sample collection

A sample of 2.5 mL of blood was collected from each patient using PaxGene venous blood vacuum collection tubes (Becton Dickinson, USA).

Microarray processing and data analysis

RNA extraction and processing for microarray analysis was performed as previously described by our group [8]. Data analysis was done using GeneSpring GX 12.0 software. The original data were cleaned and normalised in three steps: 1) local background was subtracted from the individual spot intensity; 2) log-transformed signal intensity values were globally normalised using the percentile shift algorithm, shifting to the 75th percentile of each sample, for per chip normalisation; and 3) baseline transformation of the data was performed using the median of all samples. Before statistical analyses, all microarrays were subjected to quality and filtering criteria. The quality of the microarray data was assessed on principal component analysis plots.

Student's t-tests (GeneSpring GX12.0) were used to identify genes that were differentially expressed between groups at a level of significance $p < 0.05$, with Benjamini-Hochberg multiple testing corrections and fold changes ≥ 2 . DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) & KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) were used to select, annotate and visualize genes by function and pathway [9][10]. Graphite Web software was used to represent signalling pathways present in the analysis [11]. The resulting microarray data sets were uploaded at the Array Express microarray data repository (E-MTAB-3338). Gene expression results from microarrays were validated using the Bio-Rad QX200 Droplet Digital PCR system as previously described [12]. Primers and probes were purchased to Life

Technologies (Custom TaqMan assays with probes for problem genes labeled in FAM and housekeeping gene (GAPDH) labeled in VIC) (S1 Fig).

Results

Patients' clinical characteristics (Table 1)

Most of our patients were male in their middle ages. Alcohol abuse was the most frequent cause of cirrhosis in our cohort. There were eleven patients with hepatocellular carcinoma (HCC) (36.6%). Eight patients suffered from HCV infection (26.6%). The most frequent comorbidities were diabetes mellitus and high blood pressure. The mean MELD (Model for End-Stage Liver Disease) score was 11.8, being the highest in the group of patients with no HCC. Patients with no HCC had lower albumin values and higher bilirubin levels. These patients showed in addition increased INR values. As expected, both groups of patients showed elevated levels of liver enzymes and also of C-reactive protein in serum. In turn, both had platelet counts in blood below normality.

Gene expression analysis

As said above, MELD score was lower in patients with HCC compared with that of patients with no HCC. Since this could influence gene expression profiles (GEP), we compared GEP in both groups of patients. Analysis revealed no differences between both groups regarding gene expression levels, and both groups were thus considered as a single one. Next, we compared the group of patients against healthy controls. This comparison revealed 3402 genes differentially expressed between patients with cirrhosis and controls (2802 up-regulated and 600 down-regulated) (S1 Table). DAVID/KEGG analysis revealed that these genes participate in three major groups of intracellular signaling pathways (S2 Table) we highlight below those pathways identified by the analysis at the level $p < 0.05$:

Signaling pathways involved in fibrogenesis: [extra-cellular matrix (ECM)-receptor interaction] (Fig 1), [Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) signaling pathway] (Fig 2).

Signaling pathways involved in cell adhesion: [Cell adhesion molecules (CAMs)]

Signaling pathways involved in metabolism: [Glycine, serine and threonine metabolism], [Phenylalanine metabolism], [Tyrosine metabolism], [ABC transporters], [Purine metabolism], [Arachidonic acid metabolism]

Discussion

Our study demonstrates that cirrhosis has an important impact on blood, evidencing the existence of an active transcriptomic program in circulating leukocytes, characterized by an enriched response in transcripts associated to fibrogenesis. This way, patients had a marked activation of the [ECM-receptor interaction] pathway. The extracellular matrix consists of a complex mixture of structural and functional macromolecules and serves an important role in tissue and organ morphogenesis and in the maintenance of cell and tissue structure and function. Patients showed active production of three heparan-sulfate proteins pertaining to this pathway: Agrin (AGRN), heparan sulfate proteoglycan 2 (HSPG2) and syndecan 4 (SDC4). Heparan sulfate chains, the highly sulfated glycosaminoglycans attached to the protein core of heparan sulfate proteoglycans, are intricately involved in a variety of physiological processes such as morphogenesis, wound healing, regulation of cell differentiation and growth, and

Table 1. Clinical characteristics of the patients.

	TOTAL COHORT (n = 30)	HCC (n = 11)	NO HCC (n = 19)	p	NRV
Age (mean ± SD)	57.4 ± 6.8	58.3 ± 9.4	56.8 ± 7.1	n.s.	n.a.
Male, n(%)	21 (70)	8 (27)	13 (43)	n.s.	n.a.
HCV infection	3 (10)	1 (3.3)	2 (6.4)	n.s.	n.a.
Alcoholism	17(58)	6(20)	11 (38)	n.s.	n.a.
HCV+Alcoholism	5 (16)	3 (10)	2 (6)	n.s.	n.a.
Other causes	5 (16)	1 (3.3)	4 (12.8)	n.s.	n.a.
Diabetes Mellitus II	8 (26)	3 (10)	5(16)	n.s.	n.a.
High blood pressure	11 (36)	6(20)	5 (16)	n.s.	n.a.
MELD score	11.8±3.8	9.5 ± 2.7	13.2 ± 3.7	0.015	n.a.
Hemoglobin (g/dl)	11.5±2.4	12.6 ± 2.7	10.8 ± 1.9	n.s.	13.2-16.8
Leukocytes (x10 ⁹ /μl)	5243.3±3328	4572.7 ± 2038	5631.6 ± 3887.2	n.s.	4-10.5
Neutrophil (%)	64.2±16.4	63.3 ± 17.8	64.6 ± 15.8	n.s.	41-72
Platelet (x10 ⁹ /μl)	91,5±48,9	89,2± 35,0	94,6 ± 56, 1	n.s.	150-350
ProthrombinTime (seconds)	78.6±20.2	88.6 ± 16.3	72.7 ± 20.4	0.030	60-140
INR	1.2±0.3	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.4	0.007	0.8-1.2
Glucose (mg/dl)	142.6±76.7	155 ± 87.0	134.8 ± 68.9	n.s.	82-115
Albumin (g/dl)	3.4±0.8	3.5 ± 0.6	2.9 ± 0.8	0.006	3.5-4.6
Bilirubin (mg/dl)	2.5±1.8	2.0 ± 1.3	2.9 ± 2.0	0.021	0.2-1.1
Cholesterol (mg/dl)	150.5±43.5	159.4 ± 32.9	143.6 ± 54.5	n.s.	<200
Triglycerides (mg/dl)	96.5±42.4	100.8± 51.3	83.1 ± 30.6	n.s.	<150
C Reactive Protein	30.8±81.6	12.9 ± 25.7	50.0 ± 117.8	n.s.	0-10
Uric Acid (mg/dl)	6.9±2.6	6.3± 2.2	6.7 ± 3.2	n.s.	2.6-6
AST (U/L)	78.0±92.7	73 ± 45.4	84.0 ± 108.2	n.s.	0-80
ALT (U/L)	66±55.6	87 ± 75.9	58.0± 34.9	n.s.	1.0-85
GGT (U/L)	160.1±203.9	173.8 ± 224.5	136.4 ± 185.5	n.s.	0-65
ALP (U/L)	190.4±171.5	169.4 ± 91.3	209.5 ± 224.6	n.s.	30-120

HCV: Hepatitis C Virus; HCC: hepatocellular carcinoma; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; GGT: gamma glutamyl transpeptidase; ALP: alkaline phosphatase; INR: International Normalized Ratio coagulation index; MELD (Model for End-stage Liver Disease) score; NRV: normal reference values. N.a.: not applicable.

doi:10.1371/journal.pone.0137128.t001

establishment of cell-cell and cell-extracellular matrix contacts [13]. They accumulate in the matrix of the expanding scar tissue in chronic liver diseases [14]. In fact, agrin accumulates in the liver of patients with cirrhosis, and has been proposed to play a stimulatory role in neoangiogenic processes, and a supportive role in bile ductule proliferation [14]. SDC4 has been proposed to be a sensor of tension exerted on the extracellular matrix, which is an important event in wound contraction, tumor-stroma interactions, fibrosis and the regulation of motility [15]. In mice, SDC4 knockout protects against tubulointerstitial fibrosis in the kidney [16]. Expression of thrombospondin 1 (THBS1) and of three laminin genes (LAMC3, LAMA3/ LAMA4, LAMB1) was activated also in our patients. It has been described that level of thrombospondin-1 (THBS-1) is higher in the serum of patients with hepatic fibrosis [17]. In turn, laminin is a major serum marker of liver fibrosis [18]. Patients had also increased expression of tenascin XB (TNXB). Tenascins constitute a family of matricellular proteins, primarily modulating interactions of cells with other matrix components and growth factors. Tenascin X has been shown to affect TGF-β activation and signalling, suggesting that these proteins might be important factors in fibrosis development [19]. Serum levels of Tenascin have been reported to reflect hepatic fibrogenesis and inflammation [20]. Patients with cirrhosis showed increased

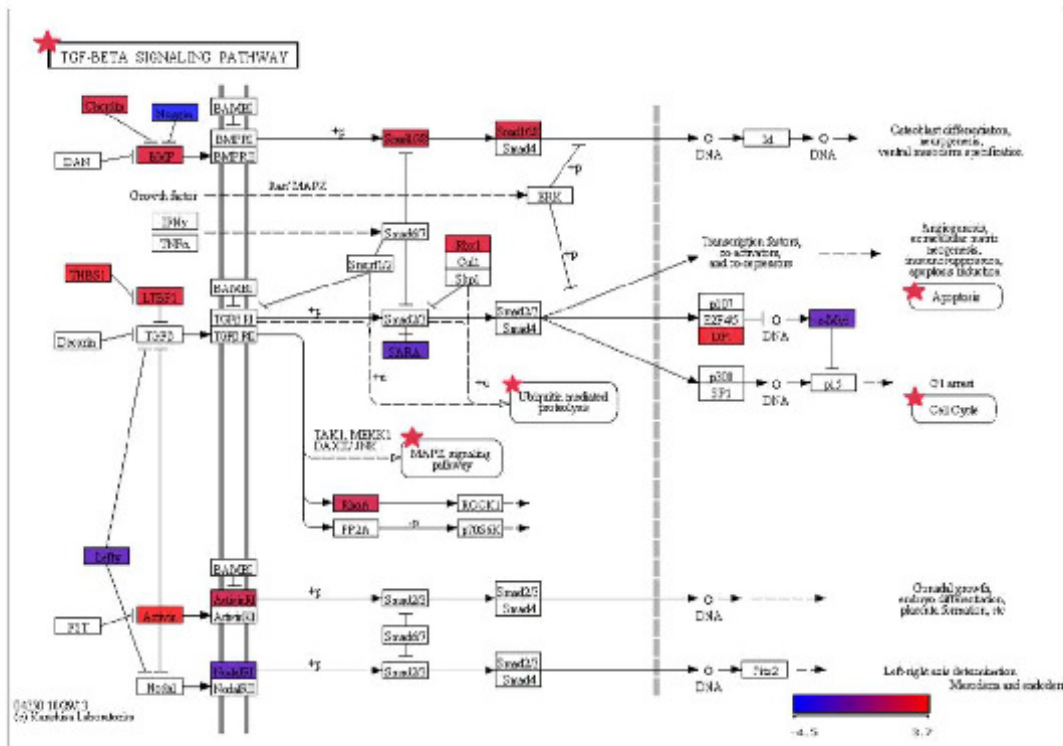


Fig 2. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes diagram representing the [Transforming Growth Factor-beta] signaling pathway. Those genes differentially expressed between patients and controls are showed by a color scale.

doi:10.1371/journal.pone.0137128.g002

heavy chain 14 (MYH14), myosin, light chain 4 (MYL4). In the liver, activation of HSCs leads to collagen deposition and hepatic fibrogenesis [2][21]. IGF2 (somatomedin A) induces in addition proliferation of hepatocytes [22].

TGF-beta signaling pathway was also activated in the group of patients, with up-regulation of growth differentiation factor 7 (GDF7), inhibin, beta C (INHBC), ras homolog family member A (RHOA), latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1), SMAD family member 5 (SMAD5), SMAD family member 9 (SMAD9), retinoblastoma-like 1 (p107) (RBL1), transcription factor Dp-1 (TFDP1), THBS1, growth differentiation factor 5 (GDF5), inhibin, beta E (INHBE), chordin (CHRD) andring-box 1, E3 ubiquitin protein ligase (RBX1). Activation of this pathway is one of the most important stimuli for extracellular matrix synthesis at the systemic level, and also in the liver [23].

The top signaling pathway identified by KEGG was [Cell Adhesion molecules]. Genes of this pathway were up-regulated in their vast majority, supporting that leukocytes from cirrhotic patients are not only activated to mediate fibrogenesis, but also to leave circulation and interact with the extracellular matrix components[24].

We found also increased expression of caveolin-1 and caveolin-2 in blood in the group of patients with cirrhosis. Yokomori et al have recently reported caveolin-1 in liver sinusoidal endothelial cells to correlate with cirrhosis progression [25]. Caveolin-1 (CAV-1) is involved in hepatic sinusoidal angiogenesis and remodeling during progression to cirrhosis [25].

Severity of liver fibrosis is known to be associated to alterations in the metabolome [26][27][28]. According to this, our work demonstrates that cirrhosis induces a wide re-programming of transcriptomic signatures involved in metabolism, as evidenced by the observed alterations in the pathways participating in aminoacid, nucleotide and arachidonic acid metabolism.

Although there are limited works on gene expression profiles in blood from patients with liver diseases, some information is available. Shi M et al found a three-gene expression signature associated to early human hepatocellular carcinoma [29], constituted by the chemokine (C-X-C motif) receptor 2 (CXCR2), C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) and the E1A-Binding Protein P400 (EP400). We failed to find this signature in our cohort of patients, neither comparing the total cohort with the controls, nor when this comparison was performed considering just those patients with HCC and controls. Differences in the nature of the two works could explain this. The study of Shi et al was performed using RNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), while our study analyzed RNA from whole blood. In consequence, gene transcripts from neutrophils were considered in our work, but not in that from Shi et al.

In conclusion, our results evidence that cirrhosis is characterized by the presence of an active pro-fibrotic program at the transcriptomic level in blood. This program could be contributing to the pathogenesis of this disease and also to that of its extra-hepatic complications (i.e atherosclerosis, cardiovascular and brain disease). Blood is a sample much easier to access than liver biopsies. Monitoring the expression levels in blood of the genes participating in the signatures identified in this work could be of interest for predicting / monitoring cirrhosis evolution and their associated metabolic complications. In addition, further works should elucidate if the genes identified here could constitute therapeutic targets in this disease.

Supporting Information

S1 Fig. PCR validation of microarray data. Expression values obtained from the microarrays for COL27A1 and COL5A1 showed a significant positive correlation, confirmed by using digital PCR. FC: Fold Change.

(TIFF)

S1 Table. List of genes differentially expressed genes between patients and controls. FC: fold change.

(XLSX)

S2 Table. Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery & Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analysis showing the main intracellular signaling pathways differentially expressed between patients and controls.

(DOCX)

Acknowledgments

We want to thank the nurse team of the Liver transplantation Unit for their dedication to our patients. We thank also to the Clinical analysis Service of our Hospital for performing the biochemistry and hematological works of this article.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GSA JFBM RA. Performed the experiments: LR VI AO. Analyzed the data: GSA JFBM PB RA. Contributed reagents/materials/analysis tools: RA. Wrote the paper: RA PB GSA JFBM. Contributed to data collection and critical review of the manuscript: CAA EMC FGP.

References

1. Zhou W-C, Zhang Q-B, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* WJG. 2014; 20: 7312-7324. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7312 PMID: 24966602
2. Puche JE, Salman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013; 3: 1473-1482. doi: 10.1002/cphy.c120035 PMID: 24265236
3. Ghaussabel D, Pasqual V, Banchereau J. Assessing the human immune system through blood transcriptomics. *BMC Biol*. 2010; 8: 84. doi: 10.1186/1741-7007-8-84 PMID: 20619006
4. Aravindhan A, Shannon N, Heaney J, Hoare M, Marshall A, Alexander GJM. The senescent hepatocyte gene signature in chronic liver disease. *Exp Gerontol*. 2014; 60: 37-45. doi: 10.1016/j.exger.2014.09.011 PMID: 25240667
5. Ahmad W, Ijaz B, Hassan S. Gene expression profiling of HCV genotype 3a initial liver fibrosis and cirrhosis patients using microarray. *J Transl Med*. 2012; 10: 41. doi: 10.1186/1479-5875-10-41 PMID: 22397681
6. Estep JM, O'Reilly L, Grant G, Piper J, Jonsson J, Afendy A, et al. Hepatic stellate cell and myofibroblast-like cell gene expression in the explanted cirrhotic livers of patients undergoing liver transplantation. *Dig Dis Sci*. 2010; 55: 496-504. doi: 10.1007/s10620-009-0919-9 PMID: 19680808
7. Utsunomiya T, Okamoto M, Wakiyama S, Hashimoto M, Fukuzawa K, Ezaki T, et al. A specific gene-expression signature quantifies the degree of hepatic fibrosis in patients with chronic liver disease. *World J Gastroenterol* WJG. 2007; 13: 383-390. PMID: 17230606
8. Almansa R, Heredia-Rodriguez M, Gomez-Sanchez E, Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Rico L, et al. Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis. *J Infect*. 2015; 70: 445-456. doi: 10.1016/j.jinf.2014.12.010 PMID: 25557485
9. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: 1-13. doi: 10.1093/nar/gkn923 PMID: 19033363
10. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009; 4: 44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211 PMID: 19131566
11. Sales G, Calura E, Cavalleri D, Romualdi C. graphite—a Bioconductor package to convert pathway topology to gene network. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 20. doi: 10.1186/1471-2105-13-20 PMID: 2292714
12. Tamayo E, Almansa R, Carrasco E, Avila-Alonso A, Rodriguez-Fernandez A, Wain J, et al. Quantification of IgM molecular response by droplet digital PCR as a potential tool for the early diagnosis of sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 2014; 18: 433. doi: 10.1186/cc13910
13. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*. 2007; 446: 1030-1037. doi: 10.1038/nature05817 PMID: 17460664
14. Tatrai P, Dudas J, Batmunkh E, Máté M, Zalatrai A, Schaff Z, et al. Agrin, a novel basement membrane component in human and rat liver, accumulates in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2006; 86: 1149-1160. doi: 10.1038/labinvest.3700475
15. Okina E, Manon-Jensen T, Whiteford JR, Couchman JR. Syndecan proteoglycan contributions to cytoskeletal organization and contractility. *Scand J Med Sci Sports*. 2009; 19: 479-489. doi: 10.1111/j.1600-0838.2009.00941.x PMID: 19538537
16. Scarpellini A, Huang L, Burhan I, Schroeder N, Funck M, Johnson TS, et al. Syndecan-4 knockout leads to reduced extracellular transglutaminase-2 and protects against tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2014; 25: 1013-1027. doi: 10.1681/ASN.2013050563 PMID: 24357671
17. Zhang B, Wang Z, Deng B, Wu X, Liu J, Feng X. Identification of Enotase 1 and Thrombospondin-1 as serum biomarkers in HBV hepatic fibrosis by proteomics. *Proteome Sci*. 2013; 11: 30. doi: 10.1186/1477-5956-11-30 PMID: 23845056
18. Zhu C, Qi X, Li H, Peng Y, Dai J, Chen J, et al. Correlation of serum liver fibrosis markers with severity of liver dysfunction in liver cirrhosis: a retrospective cross-sectional study. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8: 5989-5998. PMID: 26131195

19. Kasprzycka M, Hammarström C, Haraldsen G. Tenascin in fibrotic disorders—from bench to bedside. *Cell Adhes Migr*. 2015; 9: 83–89. doi: [10.4161/19336918.2014.994901](https://doi.org/10.4161/19336918.2014.994901)
20. Lebensztejn D-M, Sobaniec-Lotowska M-E, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with Interferon alpha. *World J Gastroenterol WJG*. 2006; 12: 3338–3343. PMID: [16733849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16733849/)
21. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25: 195–206. doi: [10.1016/j.bpg.2011.02.005](https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.005) PMID: [21497738](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21497738/)
22. Pivonello C, De Martino MC, Negri M, Cuomo G, Cariani F, Izzo F, et al. The GHGF-SST system in hepatocellular carcinoma: biological and molecular pathogenetic mechanisms and therapeutic targets. *Infect Agent Cancer*. 2014; 9: 27. doi: [10.1186/1750-9378-9-27](https://doi.org/10.1186/1750-9378-9-27) PMID: [25225571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25225571/)
23. Kovacszy I, Nagy P, Szende B, Lapis K, Szalay F, Jeney A, et al. Experimental and human liver fibrogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1998; 228: 51–55. PMID: [9867113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9867113/)
24. Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *J Glaucoma*. 2014; 23: S20–23. doi: [10.1097/IJG.000000000000108](https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000108) PMID: [25275899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25275899/)
25. Yokomori H, Ando W, Yoshimura K, Yamazaki H, Takahashi Y, Oda M. Increases in endothelial caveolin-1 and cavin3 correlate with cirrhosis progression. *Micron Ox Engl*. 1993. 2015; 76: 52–61. doi: [10.1016/j.micron.2015.03.009](https://doi.org/10.1016/j.micron.2015.03.009)
26. Sands CJ, Guha IN, Kyriakides M, Wright M, Beckoner O, Holmes E, et al. Metabolic phenotyping for enhanced mechanistic stratification of chronic hepatitis C-induced liver fibrosis. *Am J Gastroenterol*. 2015; 110: 159–169. doi: [10.1038/ajg.2014.370](https://doi.org/10.1038/ajg.2014.370) PMID: [25533003](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25533003/)
27. Tessari P, Vettore M, Millioni R, Puricelli L, Orlando R. Effect of liver cirrhosis on phenylalanine and tyrosine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010; 13: 81–86. doi: [10.1097/MCO.0b013e32833383af](https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833383af) PMID: [19898234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19898234/)
28. Sacerdoli D, Pesce P, Di Pascoli M, Brocco S, Cecchetto L, Bolognesi M. Arachidonic acid metabolites and endothelial dysfunction of portal hypertension. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015; doi: [10.1016/j.prostaglandins.2015.05.008](https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.05.008)
29. Shi M, Chen M-S, Sekar K, Tan C-K, Ooi LL, Hui KM. A blood-based three-gene signature for the non-invasive detection of early human hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer Ox Engl*. 1990. 2014; 50: 928–936. doi: [10.1016/j.ejca.2013.11.026](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.11.026)

Anexos

Anexo 1: Consentimiento Informado

Proyecto de investigación: **“ESTUDIO DE LA HUELLA MOLECULAR EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS”**

CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

Yo (nombre y apellidos) _____

He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido, por lo que presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

En.....a _____ de _____ de _____

Fdo.: _____ Fdo.: _____

El paciente o representante legal El médico responsable del paciente.

Anexo 2: Protocolo de recogida de muestras en tubos PaxGene

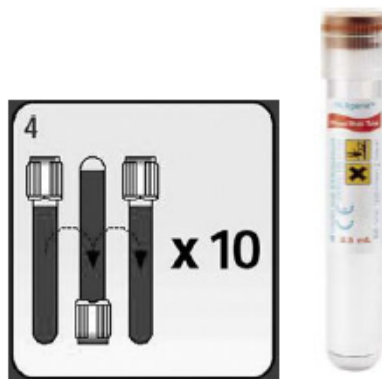
PAXgene: Recoger UN solo tubo por paciente.

Procedimiento de obtención de la muestra:

Este tubo se recogerá en último lugar. (En caso que sea necesaria una extracción previa de otros tubos).

Para realizar la extracción (2.5 ml con sistema vacutainer), declinar el tubo de tal modo que el contenido no toque la vena del paciente.

Invertir el tubo PAXgene varias veces para favorecer la mezcla (De 8 a 10 veces). Se rotula el tubo con las iniciales y la fecha.



Rotular en el tubo las iniciales del nombre y los dos apellidos del paciente, así como en número de historia. Mantener el tubo durante dos horas a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, conservar la muestra a 4º hasta su llegada al laboratorio de extracción de ARN.

Congelar a -20ºC durante 24 horas y después transferir los a -70 o -80ºC si se desea.

ORDEN RECOMENDADO DE EXTRACCIÓN

1. Tubos de suero
2. Tubos de EDTA
3. Tubos PAXgene

El orden de llenado de los tubos mejora la calidad de las muestras y la exactitud y finalidad de los resultados. La estandarización de las técnicas de extracción permite realizar esta forma protocolizada, lo que ayudará a que se trabaje con criterios de calidad.

Anexo 3: Datos clínicos

RESUMEN DE DATOS CLÍNICOS DEL PACIENTE

Centro Sanitario:

DATOS DEL PACIENTE

Iniciales del paciente:

Edad: Sexo: Hombre Mujer

Fecha nacimiento (dd/mm/aaaa):

Peso: Talla:

Antecedentes personales:

Diabetes: SI NO

Consumo Alcohol: SI NO Frecuencia (cantidad y tiempo):

Hipertensión arterial: SI NO

Otros antecedentes a destacar:

Año diagnóstico cirrosis:

Causa:

Presencia de hepatocarcinoma: SI NO Año diagnóstico:

Puntuación MELD:

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Puntuación Child-Pugh:

FECHA DE TOMA DE MUESTRAS REMITIDAS AL HURH (tubos EDTA y suero) Y AL HCUV (PaxGene):

FECHA REALIZACIÓN TRASPLANTE:

Presencia rechazo agudo leve:

Evolución: Recuperación
 Fallecido

DATOS DE LABORATORIO PREVIOS AL TRASPLANTE:

Hemograma

Hemoglobina: g/dl
Leucocitos: $\times 10^3/\mu\text{l}$
Fórmula leucocitaria (%):
Plaquetas: $\times 10^3/\mu\text{l}$

Coagulación

Tiempo de Protrombina: segundos
INR:

Bioquímica

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Glucosa: mg/dl

Creatinina: mg/dl

Albúmina: g/dl

Bilirrubina total: mg/dl

Colesterol total: mg/dl

Triglicéridos: mg/dl

Proteína C Reactiva: mg/l

Ácido úrico: mg/dl

AST: **ALT:** **GGT:** **ALP:** **(U/L)**

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Anexo 4: Base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto) para anotación, visualización e integración que muestra las principales rutas intracelulares diferencialmente expresadas entre pacientes y controles.

KEGG PATHWAY	KEGG P value	Agilent probe code	Fold Change	Gene Symbol	Description
Cell adhesion molecules (CAMs)	0.003	A_23_P109034	2.056	SDC4	Homo sapiens syndecan 4 (SDC4), mARNM [NM_002999]
		A_23_P115161	6.166	DARC	Homo sapiens Duffy blood group, chemokine receptor (DARC), transcript variant 2, mARNM [NM_002036]
		A_23_P159335	-2.899	CD8B	Homo sapiens CD8b molecule (CD8B), transcript variant 5, mARNM [NM_004931]
		A_23_P252193	2.086	ITGA9	Homo sapiens integrin, alpha 9 (ITGA9), mARNM [NM_002207]
		A_23_P311875	-2.394	CD6	Homo sapiens CD6 molecule (CD6), mARNM [NM_006725]
		A_23_P317667	2.628	ICOSLG	Homo sapiens inducible T-cell co-stimulator ligand (ICOSLG), mARNM [NM_015259]
		A_23_P411113	3.032	CNTNAP1	Homo sapiens contactin associated protein 1 (CNTNAP1), mARNM [NM_003632]
		A_23_P47410	2.280	ESAM	Homo sapiens endoThelial cell adhesion molecule (ESAM), mARNM [NM_138961]
		A_23_P49155	3.009	CDH3	Homo sapiens cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental) (CDH3), mARNM [NM_001793]
		A_23_P76034	2.721	PVRL1	Homo sapiens poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C) (PVRL1), transcript variant 3, mARNM [NM_203286]
		A_24_P252364	-2.827	NRCAM	Homo sapiens neuronal cell adhesion molecule (NRCAM), transcript variant 1, mARNM [NM_001037132]
		A_24_P295999	2.708	CD4	Homo sapiens CD4 molecule (CD4), transcript variant 1, mARNM [NM_000616]
		A_24_P320033	2.950	CD80	Homo sapiens CD80 molecule (CD80), mARNM [NM_005191]
		A_24_P385313	2.583	PTPRF	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, F (PTPRF), transcript variant 1, mARNM [NM_002840]
		A_24_P86993	-2.054	JAM3	Homo sapiens junctional adhesion molecule 3 (JAM3), transcript variant 1, mARNM [NM_032801]
		A_32_P163247	-2.656	CD8A	Homo sapiens CD8a molecule (CD8A), transcript variant 1, mARNM [NM_001768]
		A_33_P3217393	2.489	CD276	Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 1, mARNM [NM_001024736]
		A_33_P3231447	-2.528	ITGA6	Homo sapiens integrin, alpha 6 (ITGA6), transcript variant 2, mARNM [NM_000210]
		A_33_P3237574	2.205	HLA-A	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, A (HLA-A), transcript variant 2, mARNM [NM_001242758]
		A_33_P3239884	2.623	NCAM2	Homo sapiens neural cell adhesion molecule 2 (NCAM2), mARNM [NM_004540]
		A_33_P3250680	-2.369	CD40LG	Homo sapiens CD40 ligand (CD40LG), mARNM [NM_000074]
		A_33_P3272823	2.039	MAG	Homo sapiens myelin associated glycoprotein (MAG), transcript variant 1, mARNM [NM_002361]
A_33_P3285540	-2.495	CLDN5	Homo sapiens claudin 5 (CLDN5), transcript variant 1, mARNM [NM_001130861]		
A_33_P3299739	2.775	CLDN19	Homo sapiens claudin 19 (CLDN19), transcript variant 2, mARNM [NM_001123395]		

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

		A_33_P3314401	4.001	CLDN16	Homo sapiens claudin 16 (CLDN16), mARNM [NM_006580]
		A_33_P3341970	2.913	NEGR1	Homo sapiens neuronal growth regulator 1 (NEGR1), mARNM [NM_173808]
		A_33_P3369495	4.554	CLDN10	claudin 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:2033] [ENST00000376855]
		A_33_P3406873	4.192	NFASC	Homo sapiens neurofascin (NFASC), transcript variant 5, mARNM [NM_001005389]
		A_33_P3651948	3.305	NEO1	Homo sapiens neogenin 1 (NEO1), transcript variant 1, mARNM [NM_002499]
Glycine, serine and Threonine metabolism	0.003	A_23_P129064	-2.969	GATM	Homo sapiens glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase) (GATM), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_001482]
		A_23_P164258	2.836	PIPOX	Homo sapiens piperolic acid oxidase (PIPOX), mARNM [NM_016518]
		A_23_P2645	2.052	SDS	Homo sapiens serine dehydratase (SDS), mARNM [NM_006843]
		A_23_P40657	2.367	GCAT	Homo sapiens glycine C-acetyltransferase (GCAT), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2, mARNM [NM_014291]
		A_23_P4133	2.416	AOC2	Homo sapiens amine oxidase, copper containing 2 (retina-specific) (AOC2), transcript variant 1, mARNM [NM_001482]
		A_23_P85015	2.858	MAOB	Homo sapiens monoamine oxidase B (MAOB), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_000898]
		A_23_P85783	-2.611	PHGDH	Homo sapiens phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH), mARNM [NM_006623]
		A_32_P385587	3.930	ALAS2	Homo sapiens aminolevulinate, delta-, synthase 2 (ALAS2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mARNM [NM_000032]
		A_33_P3242543	5.810	MAOA	Homo sapiens monoamine oxidase A (MAOA), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_000240]
		A_33_P3250278	2.054	AGXT	Homo sapiens alanine-glyoxylate aminotransferase (AGXT), mARNM [NM_000030]
		A_33_P3257861	-2.486	SARDH	Homo sapiens sarcosine dehydrogenase (SARDH), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2, mARNM [NM_001134707]
ECM-receptor interaction	0.007	A_23_P109034	2.056	SDC4	Homo sapiens syndecan 4 (SDC4), mARNM [NM_002999]
		A_23_P23728	3.645	SV2A	Homo sapiens synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A), mARNM [NM_014849]
		A_23_P252193	2.086	ITGA9	Homo sapiens integrin, alpha 9 (ITGA9), mARNM [NM_002207]
		A_23_P26976	2.108	CHAD	Homo sapiens chondroadherin (CHAD), mARNM [NM_001267]
		A_23_P310956	-3.527	COL6A2	Homo sapiens collagen, type VI, alpha 2 (COL6A2), transcript variant 2C2a', mARNM [NM_058175]
		A_23_P343411	4.488	AGRN	Homo sapiens agrin (AGRN), mARNM [NM_198576]
		A_23_P55749	-2.818	COL5A3	Homo sapiens collagen, type V, alpha 3 (COL5A3), mARNM [NM_015719]
		A_23_P82979	2.590	LAMC3	Homo sapiens laminin, gamma 3 (LAMC3), mARNM [NM_006059]
		A_23_P89780	3.355	LAMA3	Homo sapiens laminin, alpha 3 (LAMA3), transcript variant 1, mARNM [NM_198129]
		A_24_P944964	-2.211	GP5	Homo sapiens glycoprotein V (platelet) (GP5), mARNM [NM_004488]
A_33_P3216448	6.215	COL11A2	Homo sapiens collagen, type XI, alpha 2 (COL11A2), transcript variant 4, mARNM [NM_001163771]		

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

		A_33_P3227400	-2.207	COL4A4	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 4 (COL4A4), mARNM [NM_000092]
		A_33_P3231447	-2.528	ITGA6	Homo sapiens integrin, alpha 6 (ITGA6), transcript variant 2, mARNM [NM_000210]
		A_33_P3262969	7.530	COL4A6	collagen, type IV, alpha 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:2208] [ENST00000461897]
		A_33_P3314301	3.018	SV2C	Homo sapiens synaptic vesicle glycoprotein 2C (SV2C), mARNM [NM_014979]
		A_33_P3370930	2.973	LAMB1	laminin, beta 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:6486] [ENST00000393559]
		A_33_P3380618	2.204	HSPG2	Homo sapiens heparan sulfate proteoglycan 2 (HSPG2), mARNM [NM_005529]
		A_33_P3381338	2.283	TNXB	Homo sapiens tenascin XB (TNXB), transcript variant XB, mARNM [NM_019105]
		A_33_P3415820	3.170	THBS1	Homo sapiens Thrombospondin 1 (THBS1), mARNM [NM_003246]
		A_33_P3629678	4.382	COL5A1	Homo sapiens collagen, type V, alpha 1 (COL5A1), mARNM [NM_000093]
Phenylalanine metabolism	0.015	A_23_P139527	2.107	HPD	Homo sapiens 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD), transcript variant 1, mARNM [NM_002150]
		A_23_P4133	2.416	AOC2	Homo sapiens amine oxidase, copper containing 2 (retina-specific) (AOC2), transcript variant 1, mARNM [NM_001450]
		A_23_P85015	2.858	MAOB	Homo sapiens monoamine oxidase B (MAOB), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_000898]
		A_23_P983	3.211	PRDX6	Homo sapiens peroxiredoxin 6 (PRDX6), mARNM [NM_004905]
		A_24_P330633	8.676	TAT	Homo sapiens tyrosine aminotransferase (TAT), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_000231]
		A_33_P3238433	2.068	ALDH3A1	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1 (ALDH3A1), transcript variant 1, mARNM [NM_001135168]
		A_33_P3242543	5.810	MAOA	Homo sapiens monoamine oxidase A (MAOA), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_000240]
		A_33_P3367447	2.652	ALDH3B1	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1 (ALDH3B1), transcript variant 3, mARNM [NM_001161473]
Tyrosine metabolism	0.017	A_23_P100642	-2.572	PNMT	Homo sapiens phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT), mARNM [NM_002686]
		A_23_P139527	2.107	HPD	Homo sapiens 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD), transcript variant 1, mARNM [NM_002150]
		A_23_P250164	-2.254	HGD	Homo sapiens homogentisate 1,2-dioxygenase (HGD), mARNM [NM_000187]
		A_23_P4133	2.416	AOC2	Homo sapiens amine oxidase, copper containing 2 (retina-specific) (AOC2), transcript variant 1, mARNM [NM_001450]
		A_23_P76622	2.993	DCT	Homo sapiens dopachrome tautomerase (dopachrome delta-isomerase, tyrosine-related protein 2) (DCT), transcript variant 1, mARNM [NM_001922]
		A_23_P85015	2.858	MAOB	Homo sapiens monoamine oxidase B (MAOB), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_000898]
		A_24_P268729	-2.105	HEMK1	Homo sapiens HemK methyltransferase family member 1 (HEMK1), mARNM [NM_016173]
		A_24_P330633	8.676	TAT	Homo sapiens tyrosine aminotransferase (TAT), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_000231]
		A_33_P3238433	2.068	ALDH3A1	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1 (ALDH3A1), transcript variant 1, mARNM [NM_001135168]
		A_33_P3242543	5.810	MAOA	Homo sapiens monoamine oxidase A (MAOA), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_000240]
		A_33_P3252414	2.230	TH	Homo sapiens tyrosine hydroxylase (TH), transcript variant 1, mARNM [NM_199292]

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

		A_33_P3367447	2.652	ALDH3B1	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1 (ALDH3B1), transcript variant 3, mARNM [NM_001161473]
Purine metabolism	0.039	A_23_P117580	2.305	ENTPD5	Homo sapiens ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5 (ENTPD5), mARNM [NM_001249]
		A_23_P201022	2.582	PKLR	Homo sapiens pyruvate kinase, liver and RBC (PKLR), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mARNM [NM_000298]
		A_23_P201097	2.952	GUK1	Homo sapiens guanylate kinase 1 (GUK1), transcript variant 2, mARNM [NM_000858]
		A_23_P215669	2.895	POLR2J2	Homo sapiens polymerase (ARNM) II (DNA directed) polypeptide J2 (POLR2J2), mARNM [NM_032959]
		A_23_P29096	-2.810	PDE9A	Homo sapiens phosphodiesterase 9A (PDE9A), transcript variant 1, mARNM [NM_002606]
		A_23_P36928	2.305	POLR1D	Homo sapiens polymerase (ARNM) I polypeptide D, 16kDa (POLR1D), transcript variant 1, mARNM [NM_015972]
		A_23_P401106	2.047	PDE2A	Homo sapiens phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated (PDE2A), transcript variant 1, mARNM [NM_002599]
		A_23_P402610	-2.885	PFAS	Homo sapiens phosphoribosylformylglycinamide synThase (PFAS), mARNM [NM_012393]
		A_23_P80940	-2.129	PPAT	Homo sapiens phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase (PPAT), mARNM [NM_002703]
		A_23_P9458	-2.043	POLR1E	Homo sapiens polymerase (ARNM) I polypeptide E, 53kDa (POLR1E), mARNM [NM_022490]
		A_24_P113960	3.258	NT5C1A	Homo sapiens 5'-nucleotidase, cytosolic IA (NT5C1A), mARNM [NM_032526]
		A_24_P208436	2.502	PDE1A	Homo sapiens phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent (PDE1A), transcript variant 2, mARNM [NM_001003601]
		A_24_P277657	4.205	GMPR	Homo sapiens guanosine monophosphate reductase (GMPR), mARNM [NM_006877]
		A_24_P278192	5.693	AK1	Homo sapiens adenylate kinase 1 (AK1), mARNM [NM_000476]
		A_24_P316430	-2.036	NT5E	Homo sapiens 5'-nucleotidase, ecto (CD73) (NT5E), transcript variant 1, mARNM [NM_002526]
		A_24_P342632	-2.573	AK5	Homo sapiens adenylate kinase 5 (AK5), transcript variant 1, mARNM [NM_174858]
		A_32_P834166	4.342	LOC100128843	Homo sapiens DNA polymerase epsilon catalytic subunit isoform a (POLE1) mARNM, partial cds. [AF128541]
		A_33_P3214298	-2.062	IMPDH2	Homo sapiens IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2 (IMPDH2), mARNM [NM_000884]
		A_33_P3216601	-2.234	FHIT	Homo sapiens fragile histidine triad gene (FHIT), transcript variant 1, mARNM [NM_002012]
		A_33_P3216938	3.726	AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:470] [ENST00000527261]
		A_33_P3242863	2.177	NT5M	Homo sapiens 5',3'-nucleotidase, mitochondrial (NT5M), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_020201]
		A_33_P3262580	2.350	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:3363] [ENST00000371206]
		A_33_P3318963	3.847	POLR2F	polymerase (ARNM) II (DNA directed) polypeptide F [Source:HGNC Symbol;Acc:9193] [ENST00000405557]
		A_33_P3320217	3.002	ADCY2	Homo sapiens adenylate cyclase 2 (brain) (ADCY2), mARNM [NM_020546]
		A_33_P3337161	2.605	ADCY4	Homo sapiens adenylate cyclase 4 (ADCY4), transcript variant 3, mARNM [NM_001198568]
		A_33_P3395876	2.302	PDE4A	Homo sapiens phosphodiesterase 4A, cAMP-specific (PDE4A), transcript variant 1, mARNM [NM_001111307]
		A_33_P3396459	4.168	POLR2H	polymerase (ARNM) II (DNA directed) polypeptide H [Source:HGNC Symbol;Acc:9195] [ENST00000412877]

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

		A_33_P3759611	2.015	PDE4C	Homo sapiens phosphodiesterase 4C, cAMP-specific (PDE4C), transcript variant 1, mARNM [NM_000923]
TGF-beta signaling paThway	0.039	A_23_P160336	-2.228	LEFTY1	Homo sapiens left-right determination factor 1 (LEFTY1), mARNM [NM_020997]
		A_23_P215956	-2.022	MYC	Homo sapiens v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC), mARNM [NM_002467]
		A_23_P259955	2.556	GDF5	Homo sapiens growTh differentiation factor 5 (GDF5), mARNM [NM_000557]
		A_23_P2814	2.979	SMAD9	Homo sapiens SMAD family member 9 (SMAD9), transcript variant b, mARNM [NM_005905]
		A_23_P397455	-2.180	ACVR1C	Homo sapiens activin A receptor, type IC (ACVR1C), transcript variant 1, mARNM [NM_145259]
		A_23_P502047	2.578	CHRD	Homo sapiens chordin (CHRD), mARNM [NM_003741]
		A_24_P141707	3.696	INHBE	Homo sapiens inhibin, beta E (INHBE), mARNM [NM_031479]
		A_24_P155502	3.345	INHBC	Homo sapiens inhibin, beta C (INHBC), mARNM [NM_005538]
		A_24_P945113	2.034	ACVRL1	Homo sapiens activin A receptor type II-like 1 (ACVRL1), transcript variant 1, mARNM [NM_000020]
		A_32_P143048	-2.389	ZFYVE9	Homo sapiens zinc finger, FYVE domain containing 9 (ZFYVE9), transcript variant 3, mARNM [NM_004799]
		A_32_P199301	3.392	TFDP1	Homo sapiens transcription factor Dp-1 (TFDP1), transcript variant 1, mARNM [NM_007111]
		A_33_P3220445	2.391	SMAD5	Homo sapiens SMAD family member 5 (SMAD5), transcript variant 2, mARNM [NM_001001419]
		A_33_P3246318	2.746	RBX1	Homo sapiens ring-box 1, E3 ubiquitin protein ligase (RBX1), mARNM [NM_014248]
		A_33_P3304655	2.846	LTBP1	Homo sapiens latent transforming growTh factor beta binding protein 1 (LTBP1), transcript variant 1, mARNM [NM_206943]
		A_33_P3364661	2.064	RHOA	ras homolog gene family, member A [Source:HGNC Symbol;Acc:667] [ENST00000265538]
		A_33_P3391796	-4.521	NOG	Homo sapiens noggin (NOG), mARNM [NM_005450]
		A_33_P3406240	2.778	GDF7	Homo sapiens growTh differentiation factor 7 (GDF7), mARNM [NM_182828]
		A_33_P3415820	3.170	THBS1	Homo sapiens Thrombospondin 1 (THBS1), mARNM [NM_003246]
		Arachidonic acid metabolism	0.041	A_23_P103465	2.209
A_23_P103486	-2.407			CYP2J2	Homo sapiens cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2 (CYP2J2), mARNM [NM_000775]
A_23_P3038	3.025			GPX2	Homo sapiens glutaThione peroxidase 2 (gastrointestinal) (GPX2), mARNM [NM_002083]
A_23_P321949	3.150			PLA2G2A	Homo sapiens phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid) (PLA2G2A), transcript variant 1, mARNM [NM_000300]
A_23_P8834	-2.920			EPHX2	Homo sapiens epoxide hydrolase 2, cytoplasmic (EPHX2), mARNM [NM_001979]
A_24_P191013	4.419			CYP4A11	Homo sapiens cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11 (CYP4A11), mARNM [NM_000778]
A_24_P339514	4.763			CYP2B6	Homo sapiens cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6 (CYP2B6), mARNM [NM_000767]
A_33_P3220149	2.729			MAML1	mastermind-like 1 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:13632] [ENST00000503050]
A_33_P3239849	3.534			GPX1	Homo sapiens glutaThione peroxidase 1 (GPX1), transcript variant 2, mARNM [NM_201397]
A_33_P3255304	2.101			GGT5	Homo sapiens gamma-glutamyltransferase 5 (GGT5), transcript variant 1, mARNM [NM_001099781]

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

		A_33_P3275600	3.672	PLA2G4E	Homo sapiens phospholipase A2, group IVE (PLA2G4E), mARNM [NM_001206670]
ABC transporters	0.042	A_23_P140876	-2.417	ABCA3	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3 (ABCA3), mARNM [NM_001089]
		A_23_P24774	2.016	ABCC8	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8 (ABCC8), mARNM [NM_000352]
		A_23_P401361	-2.560	PITPNM2	Homo sapiens phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2 (PITPNM2), mARNM [NM_020845]
		A_24_P16913	2.780	ABCC4	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4 (ABCC4), transcript variant 1, mARNM [NM_000451]
		A_33_P3236686	-2.055		Homo sapiens FP15331 mARNM, complete cds. [AF461897]
		A_33_P3251672	2.924	ABCA2	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2 (ABCA2), transcript variant 1, mARNM [NM_001606]
		A_33_P3298057	2.144	ABCC5	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5 (ABCC5), transcript variant 2, mARNM [NM_001023587]
		A_33_P3332414	-2.022	ABCB1	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1), mARNM [NM_000927]
		A_33_P3336780	-2.099	ABCB8	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8 (ABCB8), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_007188]
		A_33_P3361067	2.707	ABCG2	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2), mARNM [NM_004827]
		A_33_P3372563	4.358	ABCC10	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10 (ABCC10), transcript variant MRP7A, mARNM [NM_033450]
		A_33_P3422897	2.440	ABCA1	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1 (ABCA1), mARNM [NM_005502]
Cardiac muscle contraction	0.057	A_23_P110811	2.266	COX7C	Homo sapiens cytochrome c oxidase subunit VIIc (COX7C), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_001867]
		A_23_P159650	2.856	COX7B	Homo sapiens cytochrome c oxidase subunit VIIb (COX7B), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_001866]
		A_23_P31671	2.335	UQCRB	Homo sapiens ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRB), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mARNM [NM_006294]
		A_23_P414328	3.074	CACNG5	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5 (CACNG5), mARNM [NM_145811]
		A_23_P420218	2.845	CACNG8	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8 (CACNG8), mARNM [NM_031895]
		A_23_P501933	-2.095	CACNG6	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6 (CACNG6), transcript variant 1, mARNM [NM_145814]
		A_23_P56314	3.355	UQCR11	Homo sapiens ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit XI (UQCR11), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mARNM [NM_006830]
		A_23_P78571	2.879	COX6B2	Homo sapiens cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 2 (testis) (COX6B2), mARNM [NM_144613]
		A_23_P85765	2.001	CACNA1S	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit (CACNA1S), mARNM [NM_000069]
		A_24_P31275	3.105	ATP1B2	Homo sapiens ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide (ATP1B2), mARNM [NM_001678]
		A_24_P70303	2.029	CACNG4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4 (CACNG4), mARNM [NM_014405]
		A_33_P3221989	-2.450	CACNB4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit (CACNB4), transcript variant 1, mARNM [NM_001005747]

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

		A_33_P3262156	3.035	SLC8A1	Homo sapiens solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1 (SLC8A1), transcript variant A, mARNM [NM_021097]
		A_33_P3270599	-2.420	TPM2	Homo sapiens tropomyosin 2 (beta) (TPM2), transcript variant 2, mARNM [NM_213674]
		A_33_P3283669	2.727	ATP1A3	Homo sapiens ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3 polypeptide (ATP1A3), mARNM [NM_152296]
		A_33_P3335966	3.010	TPM1	Homo sapiens tropomyosin 1 (alpha) (TPM1), transcript variant 1, mARNM [NM_001018005]
Dilated cardiomyopaThy	0.062	A_23_P252193	2.086	ITGA9	Homo sapiens integrin, alpha 9 (ITGA9), mARNM [NM_002207]
		A_23_P414328	3.074	CACNG5	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5 (CACNG5), mARNM [NM_145811]
		A_23_P420218	2.845	CACNG8	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8 (CACNG8), mARNM [NM_031895]
		A_23_P501933	-2.095	CACNG6	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6 (CACNG6), transcript variant 1, mARNM [NM_145814]
		A_23_P85269	-2.425	TTN	Homo sapiens titin (TTN), transcript variant N2-A, mARNM [NM_133378]
		A_23_P85765	2.001	CACNA1S	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit (CACNA1S), mARNM [NM_000069]
		A_24_P168574	2.125	GNAS	GNAS complex locus [Source:HGNC Symbol;Acc:4392] [ENST00000481768]
		A_24_P70303	2.029	CACNG4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4 (CACNG4), mARNM [NM_014405]
		A_33_P3221989	-2.450	CACNB4	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit (CACNB4), transcript variant 1, mARNM [NM_001005747]
		A_33_P3231447	-2.528	ITGA6	Homo sapiens integrin, alpha 6 (ITGA6), transcript variant 2, mARNM [NM_000210]
		A_33_P3262156	3.035	SLC8A1	Homo sapiens solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1 (SLC8A1), transcript variant A, mARNM [NM_021097]
		A_33_P3270599	-2.420	TPM2	Homo sapiens tropomyosin 2 (beta) (TPM2), transcript variant 2, mARNM [NM_213674]
		A_33_P3275801	2.913	DES	Homo sapiens desmin (DES), mARNM [NM_001927]
		A_33_P3284763	3.029	DMD	Homo sapiens dystrophin (DMD), transcript variant Dp140b, mARNM [NM_004021]
		A_33_P3311285	4.553	LMNA	Homo sapiens lamin A/C (LMNA), transcript variant 1, mARNM [NM_170707]
		A_33_P3320217	3.002	ADCY2	Homo sapiens adenylate cyclase 2 (brain) (ADCY2), mARNM [NM_020546]
		A_33_P3335966	3.010	TPM1	Homo sapiens tropomyosin 1 (alpha) (TPM1), transcript variant 1, mARNM [NM_001018005]
		A_33_P3337161	2.605	ADCY4	Homo sapiens adenylate cyclase 4 (ADCY4), transcript variant 3, mARNM [NM_001198568]
Primary immunodeficiency	0.063	A_23_P107735	2.947	CD79A	Homo sapiens CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha (CD79A), transcript variant 1, mARNM [NM_001783]
		A_23_P159335	-2.899	CD8B	Homo sapiens CD8b molecule (CD8B), transcript variant 5, mARNM [NM_004931]
		A_23_P329112	2.016	JAK3	Homo sapiens Janus kinase 3 (JAK3), mARNM [NM_000215]
		A_23_P404494	-2.201	IL7R	Homo sapiens interleukin 7 receptor (IL7R), mARNM [NM_002185]
		A_23_P84705	-2.090	TNFRSF13B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B (TNFRSF13B), mARNM [NM_012452]

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

		A_24_P169234	-2.149	ZAP70	Homo sapiens zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa (ZAP70), transcript variant 1, mARNM [NM_001079]
		A_24_P295999	2.708	CD4	Homo sapiens CD4 molecule (CD4), transcript variant 1, mARNM [NM_000616]
		A_32_P163247	-2.656	CD8A	Homo sapiens CD8a molecule (CD8A), transcript variant 1, mARNM [NM_001768]
		A_33_P3250680	-2.369	CD40LG	Homo sapiens CD40 ligand (CD40LG), mARNM [NM_000074]
Axon guidance	0.079	A_23_P108501	-2.186	EPHA4	Homo sapiens EPH receptor A4 (EPHA4), mARNM [NM_004438]
		A_23_P113005	2.407	EFNA1	Homo sapiens ephrin-A1 (EFNA1), transcript variant 1, mARNM [NM_004428]
		A_23_P114057	-2.049	SEMA4C	Homo sapiens sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C (SEMA4C), mARNM [NM_017789]
		A_23_P119535	2.976	EFNA2	Homo sapiens ephrin-A2 (EFNA2), mARNM [NM_001405]
		A_23_P157333	-2.447	EPHA1	Homo sapiens EPH receptor A1 (EPHA1), mARNM [NM_005232]
		A_23_P162449	2.794	SRGAP1	Homo sapiens SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1 (SRGAP1), mARNM [NM_020762]
		A_23_P202520	-2.772	ABLIM1	Homo sapiens actin binding LIM protein 1 (ABLIM1), transcript variant 3, mARNM [NM_001003408]
		A_23_P57667	-2.403	PLXNA1	Homo sapiens plexin A1 (PLXNA1), mARNM [NM_032242]
		A_23_P69617	4.221	UNC5C	Homo sapiens unc-5 homolog C (C. elegans) (UNC5C), mARNM [NM_003728]
		A_23_P87082	3.123	ROBO3	Homo sapiens roundabout, axon guidance receptor, homolog 3 (Drosophila) (ROBO3), mARNM [NM_022370]
		A_23_P95165	2.142	SEMA4B	Homo sapiens sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B (SEMA4B), transcript variant 1, mARNM [NM_020210]
		A_24_P114032	2.136	EFNA3	Homo sapiens ephrin-A3 (EFNA3), mARNM [NM_004952]
		A_24_P313822	2.292	PAK4	Homo sapiens p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4 (PAK4), transcript variant 1, mARNM [NM_005884]
		A_32_P195065	-2.249	SEMA4F	Homo sapiens sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F (SEMA4F), mARNM [NM_004263]
		A_33_P3220160	2.115	RAC2	Homo sapiens cDNA FLJ39605 fis, clone SKNSH2005981, weakly similar to RAS-RELATED C3 BOTULINUM TOXIN SUBSTRATE 2. [AK096924]
		A_33_P3288609	2.646	PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:8590] [ENST00000526968]
		A_33_P3364661	2.064	RHOA	ras homolog gene family, member A [Source:HGNC Symbol;Acc:667] [ENST00000265538]
		A_33_P3368540	2.056		SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:19744] [ENST00000490889]
		A_33_P3370787	2.658	EPHB2	Homo sapiens EPH receptor B2 (EPHB2), transcript variant 2, mARNM [NM_004442]
		A_33_P3379001	2.902	UNC5A	Homo sapiens unc-5 homolog A (C. elegans) (UNC5A), mARNM [NM_133369]
		A_33_P3413048	-2.688	PLXNA3	Homo sapiens plexin A3 (PLXNA3), mARNM [NM_017514]
		A_33_P3416707	2.090	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:9611] [ENST00000342207]
		A_33_P3712341	3.284	CXCL12	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12), transcript variant 3, mARNM [NM_001033886]

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

Adherens junction	0.095	A_23_P301304	-2.128	FGFR1	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1), transcript variant 1, mARNM [NM_023110]
		A_23_P308603	2.223	SRC	Homo sapiens v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian) (SRC), transcript variant 1, mARNM [NM_005417]
		A_23_P315836	-2.193	BAIAP2	Homo sapiens BAI1-associated protein 2 (BAIAP2), transcript variant 2, mARNM [NM_017451]
		A_23_P397455	-2.180	ACVR1C	Homo sapiens activin A receptor, type IC (ACVR1C), transcript variant 1, mARNM [NM_145259]
		A_23_P7582	-2.547	TCF7	Homo sapiens transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box) (TCF7), transcript variant 1, mARNM [NM_003202]
		A_23_P76034	2.721	PVRL1	Homo sapiens poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C) (PVRL1), transcript variant 3, mARNM [NM_203286]
		A_24_P20630	-2.738	LEF1	Homo sapiens lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1), transcript variant 1, mARNM [NM_016269]
		A_24_P317907	4.794	SORBS1	Homo sapiens sorbin and SH3 domain containing 1 (SORBS1), transcript variant 3, mARNM [NM_001034954]
		A_24_P385313	2.583	PTPRF	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, F (PTPRF), transcript variant 1, mARNM [NM_002840]
		A_33_P3220160	2.115	RAC2	Homo sapiens cDNA FLJ39605 fis, clone SKNSH2005981, weakly similar to RAS-RELATED C3 BOTULINUM TOXIN SUBSTRATE 2. [AK096924]
		A_33_P3243812	2.459	WASF1	Homo sapiens WAS protein family, member 1 (WASF1), transcript variant 1, mARNM [NM_003931]
		A_33_P3280801	-2.218	LMO7	Homo sapiens LIM domain 7 (LMO7), transcript variant 1, mARNM [NM_005358]
		A_33_P3303372	-2.007	PARD3	Homo sapiens par-3 partitioning defective 3 homolog (C. elegans) (PARD3), transcript variant 9, mARNM [NM_001184792]
		A_33_P3319155	2.273	ACP1	Homo sapiens acid phosphatase 1, soluble (ACP1), transcript variant 4, mARNM [NM_001040649]
		A_33_P3364661	2.064	RHOA	ras homolog gene family, member A [Source:HGNC Symbol;Acc:667] [ENST00000265538]

Bibliografía

Bibliografía

1. García Buey L, González Mateos F, Moreno-Otero R, “Cirrosis hepática”. *Medicine*.2012; 11: 625-33 - Vol. 11 Núm.11.
2. Lefton HB, Rosa A, Cohen M, “Diagnosis and epidemiology of cirrhosis”. *Med Clin North Am*. 2009; 93.787-99.
3. Zhou W-C, Zhang Q-B, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol WJG*. 2014; 20: 7312–7324.
4. Ganem D, Prince AM, “Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences”. *New England J Med* 2004; 350: 1118-1129.
5. OPTN & SRTR Annual Data Report 2011: Liver: (2011); 73-102.
6. Lazo M, HeARNmez R, Bonekamp S, Kamel IR, Brancati FL, Guallar E, Clark JM, “Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study”. *BMJ* 2011; 343: d6891.
7. Geoffrey W. McCaughan *et al*. Molecular pathogenesis of liver disease: an approach to hepatic inflammation, cirrhosis and liver transplant tolerance. *Immunological Reviews* 174/2000.
8. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. “Hepatic stellate cells and liver fibrosis”. *Compr Physiol*. 2013; 3: 1473–1492.
9. Schuppan D, Afdhal NH. Liver Cirrhosis. *Lancet*. 2008; 371(9615):838-851.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

10. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*. 2005; 172(3):367-379.
11. Pratt D, Kaplan M. "Evaluation of the Liver A: Laboratory Tests. In: Schiff's Diseases of the Liver" Eighth Edition, Philadelphia 1999, p. 205.
12. Kazemi-Shirazi L, Veloso MP, Frommlet F, Steindl-Munda P, Wrba F, Zehetmayer S, Marsik C, Ferenci P "Differentiation of nonalcoholic from alcoholic steatohepatitis: are routine laboratory markers useful". *Wien Klin Wochenschr*. 2008; 120(1-2):25-30.
13. Triger DR, Wright R. Hyperglobulinaemia in liver disease. *Lancet* 1973; 1: 1494–96.
14. Papadakis MA, Fraser CL, Arief AI. Hyponatraemia in patients with cirrhosis. *Q J Med* 1990; 76: 675– 88.
15. Peck-Radosavljevic M, Wichlas M, Zacherl J, et al. Thrombopoietin induces rapid resolution of thrombocytopenia after orthotopic liver transplantation through increased platelet production. *Blood* 2000; 95:795–801.
16. Van Ness MM, Diehl AM "Liver biopsy as Gold Standard. Is liver biopsy useful in the evaluation of patients with chronically elevated liver enzymes". *Ann Intern Med*. 1989; 111(6): 473.
17. Morita Y, Ueno T, Sasaki N, Kuhara K, Yoshioka S, Tateishi Y, Nagata E, Kage M, Sata M "Comparison of liver histology between patients with non-alcoholic steatohepatitis and patients with alcoholic steatohepatitis in Japan" *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Dec; 29(12 Suppl): 277S-81S.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

18. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 2008;48: 835–47.
19. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: A new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29: 1705–13.
20. Arena U, Vizzutti F, Corti G, Ambu S, Stasi C, Bresci S, et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology.* 2008; 47: 380–4.
21. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, et al. Non invasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2005; 41: 48–54.
22. Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, Rega L, Foschi M, Colagrande S, et al. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology.* 2007; 45: 1290–7.
23. Sánchez Antolin G1, Garcia Pajares F, Vallecillo MA, FeARNmndez Orcajo P, Gómez de la Cuesta S, Alcaide N, Gonzalez Sagrado M, Velicia R, Caro-Patón A, “FibroScan evaluation of liver fibrosis in liver transplantation”. *Transplant Proc.* 2009 Apr;41(3):1044-6.
24. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH “The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature and classification by a

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

working group sponsored by the World Health Organization". *J Clin Pathol.* 1978; 31: 395-414.

25. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362:1907–17.

26. Luo JC, Hwang SJ, Wu JC, Lai CR, Li CP, Chang FY, Chiang JH, Lui WY, Chu CW, Lee SD "Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma patients with paraneoplastic syndromes" *Hepatogastroenterology.* 2002 Sep; 49(47):1315-9.

27. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127(5 Suppl 1):S35–50.

28. Chen DS, Sung JL, Sheu JC, Lai MY, How SW, Hsu HC, Lee CS, Wei TC "Serum alpha-fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma" *Gastroenterology.* 1984; 86(6):1404.

29. [http://www.scribd.com/doc/3902347/The-Milan-Criteria-for HCC.](http://www.scribd.com/doc/3902347/The-Milan-Criteria-for-HCC)

30. Sherman M, Klein A. AASLD single-topic research conference on hepatocellular carcinoma: Conference proceedings. *Hepatology* 2004; 40: 1465–73.

31. Child CG, Turcotte JG, "Surgery and portal hypertension" *Major Probl Clin Surg.* 1964; 1: 1-85.

32. Pugh RN, Murray-Lyon LM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. "Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices". *Br J Surg.* 1973; 60: 646-9.

33. [http://www.mayoclinic.org/medical-professionals/model-end-stage-liver-disease\).](http://www.mayoclinic.org/medical-professionals/model-end-stage-liver-disease)

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

- 34.** Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J and Borg CJ, "A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*. 2000; 31: 864–871.
- 35.** Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL *et al* "A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2011; 33: 464-70.
- 36.** Durand F, Valla D "Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD". *J Hepatol*. 2005; 42 Suppl: S100-7.
- 37.** Freeman RB, Wiesner RH, Harper A, et al, "UNOS/OPTN Liver Disease Severity Score, UNOS/OPTN Liver and Intestine, and UNOS/OPTN Pediatric Transplantation Committees: The New Liver Allocation System: Moving Toward Evidence-Based Transplantation Policy". 2002. *Liver Transpl* 8:851.
- 38.** Vinay K, Ramzi SC and Stanley LR, "Patología Humana". 2005. Elsevier.
- 39.** Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *JourNml of Clinical Investigation*. 2005;115(2):209-218.
- 40.** Lee UE, Friedman SL. "Mechanisms of hepatic fibrogenesis". *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25: 195–206.
- 41.** Bataller R, Rombouts K, Altamirano J, "Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis". *Liver Fibrosis*, Volume 25, Issue 2, 2011, 231-234.
- 42.** Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. "The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis". *Apoptosis* 2005; 10: 927-939.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

- 43.** Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, Ghosh S, Li T, McKillop IH, Russo MW, Bonkovsky HL, Schrum LW, "Inhibitory effects of microARNM 19b in hepatic stellate cells mediated fibrogenesis" *Hepatology*. 2012; 56: 300-310.
- 44.** Safadi R, Friedman SL. "Hepatic fibrosis role of hepatic stellate cell activation". *Med Gen Med*. 2002; 4: 27.
- 45.** Deleve LD, Wang X, Guo Y. "Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence". *Hepatology*. 2008; 48: 920-930.
- 46.** Urbanik T, Boger RJ, Longerich T, Becker K, Ehrenberg KR, Hovelmeyer N, Hahn M, Schuchmann M, Jager D, Waisman A, Worns MA, Schulze-Bergkamen H, " Liver specific deletion of CYLDexon7/8 induces severe biliary damage, fibrosis and increases hepatocarcinogenesis in mice". *J Hepatol* 2012; 57: 995-1003.
- 47.** Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E, "Role of kupffer cells in the pathogenesis of liver disease". *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7413-7420.
- 48.** Matsuoka M, Zhang MY, Tsukamoto H, "Sensitization of hepatic lipocytes by high-fat diet to stimulatory effects of Kupffer cell-derived factors: implication in alcoholic liver fibrogenesis" *Hepatology*. 1990; 11: 173-182.
- 49.** Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R, "Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis". *J Hepatol*. 2007; 46: 1064-1074.
- 50.** Pinzani M "PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells" *Front Biosci*. 2002; 7: d1720-d1726.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

51. Bataller R, Brenner DA, "Liver fibrosis". J Clin Invest. 2005; 115: 209-218.
52. Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG "Hepatitis C and liver fibrosis". Cell Death Differ. 2003; 10 Suppl 1: S59-S67.
53. Liu X, Hu H, Yin JQ, "Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis". Liver Int. 2006; 26: 8-22.
54. Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St Clair J, Mitchell AP, Ibrahim J, Stroud A, Pachter HL, Bar-Sagi D, Frey AB, Miller G, "Liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha". J Clin Invest. 2009; 119: 3213-3225.
55. Ogawa T, Kawada N, Ikeda K, "Effect of natural interferon- α on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells". Hepatol Int. 2009; 3: 497-503.
56. Saile B, Eisenbach C, Dudas J, El-Armouche H, Ramadori G, "Interferon-gamma acts proapoptotic on hepatic stellate cells (HSC) and abrogates the antiapoptotic effect of interferon-alpha by an HSP70-dependant pathway". Eur J Cell Biol. 2004; 83: 469-476.
57. Gieling RG, Wallace K, Han YP, "Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis" Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009; 296: G1324-G1331.
58. Du WJ, Zhen JH, Zeng ZQ, Zheng ZM, Xu Y, Qin LY, Chen SJ, "Expression of interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection: IL-17 in HBV infection". Diagn Pathol. 2013; 8: 40.
59. Jiang S, "TH17 Cells in Health and Disease". ISBN 978-1-4419-9370-0.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

60. 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.

61. Chou W, Lu CN, Lee TH, Wu CL, Hung KS, Concejero AM, Jawan B, Wang CH. "Electroporative interleukin-10 gene transfer ameliorates carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis by MMP and TIMP modulation". *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 469-476.

62. Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. "Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; 118: 655-660.

63. Gieling RG, Burt AD, Mann DA, "Fibrosis and cirrhosis reversibility - molecular mechanisms". *Clin Liver Dis.* 2008; 12: 915-937.

64. Wang X, Zhang R, Du J, Hu Y, Xu L, Lu J, Ye S, "Vitamin E reduces hepatic fibrosis in mice with *Schistosoma japonicum* infection. *Mol Med Rep* 2012; 5: 465-468.

65. Oakley F, Meso M, Iredale JP, Green K, Marek CJ, Zhou X, May MJ, Millward-Sadler H, Wright MC, Mann DA, "Inhibition of inhibitor of kappa B kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis". *Gastroenterology.* 2005; 128: 108-120.

66. Saller R, Meier R, Brignoli R, "The use of silymarin in the treatment of liver diseases". *Drugs.* 2001; 61: 2035-2063.

67. Zhang SH, Wen KM, Wu W, Li WY, Zhao JN, "Efficacy of HGF carried by ultrasound microbubble-cationic nanoliposomes complex for treating hepatic fibrosis in a bile duct

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

ligation rat model, and its relationship with the diffusion-weighted MRI parameters".

Clin Res Hepatol Gastroenterol 2013; 37: 602-607.

68. Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F and Golstein P. "CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger ARN instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene". J Immunol (1993), 150(12), 5445–5456.

69. Universidad Santiago de Compostela. Unidad de Expresión Génica-Tecnología

Affymetrix:<http://www.usc.es/es/investigacion/riaidt/secuenciacion/affymetrix>

70. Chaussabel D, Pascual V, Banchereau J. "Assessing the human immune system through blood transcriptomics. BMC "Biol. 2010; 8: 84.

71. Aravinthan A, Shannon N, Heaney J, Hoare M, Marshall A, Alexander GJM. "The senescent hepatocyte gene signature in chronic liver disease". Exp Gerontol. 2014; 60: 37–45.

72. Ahmad W, Ljaz B, Hassan S. "Gene expression profiling of HCV genotype 3a initial liver fibrosis and cirrosis patients using microarray". J Transl Med. 2012; 10: 41.

73. Estep JM, O'Reilly L, Grant G, Piper J, Jonsson J, Afendy A, et al. "Hepatic stellate cell and myofibroblast-like cell gene expression in the explanted cirrhotic livers of patients undergoing liver transplantation". Dig Dis Sci. 2010; 55: 496–504.

74. Utsunomiya T, Okamoto M, Wakiyama S, Hashimoto M, Fukuzawa K, Ezaki T, et al. "A specific gene expression signature quantifies the degree of hepatic fibrosis in patients with chronic liver disease". World J Gastroenterol WJG. 2007; 13: 383–390.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

75. P. QIAGEN, "PAXgene Blood ARNM Kit Handbook".
76. Agilent Technologies "One-Color Microarray-based Gene Expression Analysis".
77. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists". *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 1–13.
78. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources". *Nat Protoc.* 2009; 4: 44–57.
79. Sales G, Calura E, Cavalieri D, Romualdi C. "Graphite—a Bioconductor package to convert pathway topology to gene network". *BMC Bioinformatics.* 2012; 13: 20.
80. Ormonde DG, de Boer WB, Kierath A, Bell R *et al.* "Banff schema for grading liver allograft rejection: utility in clinical practice". *Liver transpl Surg.* 1999; 5: 261-8.
81. Sinn DH, Paik SW, Kang P, *et al.* "Disease progression and the risk factor analysis for chronic hepatitis C". *Liver Int.* 2008 Dec; 28(10):1363-9.
82. Wang X, Lin S-X, Tao J, *et al.* "Study of liver cirrhosis over ten consecutive years in Southern China". *World Journal of Gastroenterology.* 2014; 20 (37):13546-13555.
83. Garcia-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Gonzalez-Gonzalez JA, Maldonado-Garza H. "Liver cirrhosis and diabetes: Risk factors, pathophysiology, clinical implications and management". *World Journal of Gastroenterology.* 2009; 15 (3):280-288.
84. El-Serag HB, Everhart JE. "Diabetes increases the risk of acute hepatic failure". *Gastroenterology.* 2002; 122: 1822-1828.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

- 85.** Bianchi G, Marchesini G, Zoli M, Bugianesi E, Fabbri A, Pisi E. "Prognostic significance of diabetes in patients with cirrhosis" *Hepatology*. 1994; 20(1 Pt 1):119.
- 86.** Pradella P, Bonetto P, Turchetto S, Uxa S, Comar L, Zorat C, De Angelis F, Pozzato V, "Platelet production and destruction in liver cirrhosis". *JouARNml of Hepatology* 894-900-54, 5 0168-8278.
- 87.** Xianghong G, Guanping C, Fenghua Y, Jiayin W. "Changes in platelet functional parameters and CD62P expression in liver cirrhosis". *African Health Sciences*. 2013; 13(4):1079-1083.
- 88.** Kim J, Lee K, Cho J. "Factor analysis of the biochemical markers related to liver cirrhosis". *Pakistan JouARNml of Medical Sciences*. 2015; 31(5): 1043-1046.
- 89.** Moss DW. "Physiochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells". *Clin Chim Acta* 1997;257 (1):133-40.
- 90.** Ellis G, Goldberg DM, Spooner RJ, Ward AM "Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree". *Am J Clin Pathol*. 1978; 70(2):248.
- 91.** Chaussabel D, Pascual V and Banchereau J "Assessing the human immune system through blood transcriptomics" *BMC Biol*, 8, 84.
- 92.** Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. "Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology". *Nature*. 2007; 446: 1030–1037.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

- 93.** Tátrai P, Dudás J, Batmunkh E, Máthé M, Zalatnai A, Schaff Z, *et al.* “Agrin, a novel basement membrane component in human and rat liver, accumulates in cirrhosis and hepatocellular carcinoma”. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2006; 86: 1149–1160.
- 94.** Okina E, Manon-Jensen T, Whiteford JR, Couchman JR. “Syndecan proteoglycan contributions to cytoskeletal organization and contractility”. *Scand J Med Sci Sports.* 2009; 19: 479–489.
- 95.** Scarpellini A, Huang L, Burhan I, Schroeder N, Funck M, Johnson TS, *et al.* “Syndecan-4 knockout leads to reduced extracellular transglutaminase-2 and protects against tubulointerstitial fibrosis”. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2014; 25: 1013–1027.
- 96.** Zhang B, Wang Z, Deng B, Wu X, Liu J, Feng X. “Identification of Enolase 1 and Thrombospondin-1 as serum biomarkers in HBV hepatic fibrosis by proteomics”. *Proteome Sci.* 2013; 11: 30.
- 97.** Zhu C, Qi X, Li H, Peng Y, Dai J, Chen J, *et al.* “Correlation of serum liver fibrosis markers with severity of liver dysfunction in liver cirrhosis: a retrospective cross-sectional study”. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8: 5989–5998.
- 98.** Kasprzycka M, Hammarström C, Haraldsen G. “Tenascins in fibrotic disorders-from bench to bedside”. *Cell Adhes Migr.* 2015; 9: 83–89.
- 99.** Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. “Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha”. *World J Gastroenterol WJG.* 2006; 12: 3338–3343.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

- 100.** Pivonello C, De Martino MC, Negri M, Cuomo G, Cariati F, Izzo F, *et al.* “The GH-IGF-SST system in hepatocellular carcinoma: biological and molecular pathogenetic mechanisms and therapeutic targets”. *Infect Agent Cancer*. 2014; 9: 27.
- 101.** Panopoulos AD and Watowich SS, “Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and emergency hematopoiesis”, *Cytokine*, 42 (2008), 277-88.
- 102.** Kovalszky I, Nagy P, Szende B, Lapis K, Szalay F, Jeney A, *et al.* “Experimental and human liver fibrogenesis”. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1998; 228: 51–55.
- 103.** Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. “Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology”. *Nature*. 2007; 446: 1030–1037.
- 104.** Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141: 52-67.
- 105.** Pinzani M *et al.* “Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management”. *JouARNml of Hepatology*, Volume 42, Issue 1, S22 - S36.
- 106.** Cao S, Yaqob U, Das A, *et al.* “Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF- β signaling in hepatic stellate cells”. *The JouARNml of Clinical Investigation*. 2010;120(7):2379-2394.
- 107.** Kershenovich D, Weissbrod AB, “Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol*. 2003 Oct-Dec;2(4):159-63.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

108. Yokomori H, Ando W, Yoshimura K, Yamazaki H, Takahashi Y, Oda M. "Increases in endothelial caveolin-1 and caveolins correlate with cirrhosis progression". *Micron Oxf Engl*. 1993. 2015; 76: 52–61.

109. Sands CJ, Guha IN, Kyriakides M, Wright M, Beckonert O, Holmes E, *et al.* "Metabolic phenotyping for enhanced mechanistic stratification of chronic hepatitis C-induced liver fibrosis". *Am J Gastroenterol*. 2015; 110: 159–169.

110. Tessari P, Vettore M, Millionsi R, Puricelli L, Orlando R. "Effect of liver cirrhosis on phenylalanine and tyrosine metabolism". *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010; 13: 81–86.

111. Benga G, Ferdinand W, "Amino acid composition of rat and human liver microsomes in normal and pathological conditions". *Bioscience Reports*, Apr 1995,15 (2)111-116.

112. Sacerdoti D, Pesce P, Di Pascoli M, Brocco S, Cecchetto L, Bolognesi M. "Arachidonic acid metabolites and endothelial dysfunction of portal hypertension". *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015.

113. Francavilla A, Jones AF, Starzl TE. "Cyclic AMP metabolism and adenylate cyclase concentration in patients with advanced hepatic cirrhosis". *Gastroenterology*. 1978; 75(6):1026-1032.

114. Mallat A, Préaux AM, Serradeil-Le Gal C, *et al.* "Growth inhibitory properties of endothelin-1 in activated human hepatic stellate cells: a cyclic adenosine monophosphate-mediated pathway. Inhibition of both extracellular signal-regulated

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

kinase and c-Jun kinase and upregulation of endothelin B receptors". *Journal of Clinical Investigation*. 1996; 98(12):2771-2778.

115. Ruiz-del-Árbol L, Serradilla R. "Cirrhotic cardiomyopathy". *World J Gastroenterol* 2015; 21(41): 11502-11521.

116. Burca P, Mihai B, Mihai C, Drug VL, Dranga M, Lacatușu C, Prelipcean C. "Cardiomyopathy in liver cirrhosis an undiagnosed entity" *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2010 Apr-Jun; 114(2):319-26.

117. Jones PM, George AM. "The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research". *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004. 61 (6): 682–99.

118. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J."Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2008. 72 (2): 317–64, table of contents.

119. Zuñiga-García V, Chávez-López G, Quintanar- Jurado V, Gabino-López N, Hernández-Gallegos E, Soriano-Rosas J, Pérez-Carreo J, Camacho J, "Differential Expression of Ion Channels and Transporters During Hepatocellular Carcinoma Development". *Dig Dis Sci* (2015) 60:2373–2383.

120. Bonin S, Pascolo L, Crocè LS, Stanta G, Tiribelli C. "Gene expression of ABC proteins in hepatocellular carcinoma, perineoplastic tissue, and liver diseases". *Molecular Medicine*. 2002; 8(6):318-325.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

- 121.** Dhirapong A, Lleo A, Yang G, *et al.* “B cell depletion therapy exacerbates murine primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2011; 53(2): 527-535.
- 122.** Junliang F *et al.* “Increased Regulatory T Cells Correlate with CD8 T-Cell Impairment and Poor Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients”. *Gastroenterology*, Volume 132, Issue 7, 2328 – 2339.
- 123.** Pulvirenti F, Pentassuglio I, Milito C, *et al.* “Idiopathic Non Cirrhotic Portal Hypertension and Spleno-Portal Axis Abnormalities in Patients with Severe Primary Antibody Deficiencies”. *JouARNml of Immunology Research*. 2014; 6724-58.
- 124.** Tugues S, FeARNmndez-Varo G, Muñoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodés, J, Friedman S, Carmeliet P, Jiménez W and Morales-Ruiz M, “Antiangiogenic treatment with Sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats”. 2007. *Hepatology*, 46: 1919–1926.
- 125.** Shi M, Chen M-S, Sekar K, Tan C-K, Ooi LL, Hui KM. “A blood-based three-gene signature for the noninvasive detection of early human hepatocellular carcinoma”. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2014; 50: 928–936.
- 126.** Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, Cong M, Iwaisako K, Liu X, Zhang M, *et al.* “Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2012; 143:765–766.
- 127.** Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL “Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C”. *Gastroenterology*. 2000; 118:655–660.

RESPUESTA ACTIVA PROFIBRÓTICA EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

128. Venteclef N and Delerive P, "Interleukin-1 receptor antagonist induction as an additional mechanism for liver receptor homolog-1 to negatively regulate the hepatic acute phase response", *J Biol Chem*, 282 (2007), 4393-9.

129. Stumhofer J, Laurence A, Wilson E, Huang E, Tato C, Johnson L, Villarino A, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris C, O'Shea J, Hennighausen L, Ernst M and Hunter C "Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system" *Nature Immunology* 7, 937 - 945 (2006), 1529-2908.

130. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, Wang YH, Schluns KS, Broaddus RR, Zhu Z, Dong C "Regulation of inflammatory responses by IL-17F". *J Exp Med*. 2008 May 12; 205 (5):1063-75.

131. Gehrau RC, Archer KJ, Mas VR, Maluf DG" Molecular Profiles of HCV Cirrhotic Tissues Derived in a Panel of Markers with Clinical Utility for Hepatocellular Carcinoma Surveillance". *PLoS ONE*. 2012. 7(7).

