



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PLAN DE ESTUDIOS COMBINADOS EN MEDICINA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

**La Galectina-3 en el Proceso Inflamatorio Asociado a  
Insuficiencia Hepática Aguda Sobre Crónica**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN MEDICINA**

PRESENTA:  
**EDUARDO CERVANTES ALVAREZ**

TUTOR PRINCIPAL  
Nalú Navarro Álvarez  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
David Kershenobich Stalnikowitz  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Mario Vilatobá Chapa  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., OCTUBRE DE 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

*A mis padres, Hugo y Marce, y mi hermana, Gaby, por su invaluable apoyo y motivación durante todos estos años de estudio y carrera. Ustedes son mi fuerza día a día. ¡Los quiero muchísimo!*

*En memoria a mi tito, el Ing. Francisco Alvarez, quien estaría muy orgulloso de ver a su nieto doctor graduarse del doctorado y seguir adelante en su camino de estudios*

*A mi abuela y mi tita, Tere e Irma, por su cariño infinito y por siempre estar pendientes de mis avances.*

*A mi madrina y padrino, Tere y Arturo, quienes con toda su motivación han acompañado de cerca a su ahijado en su crecimiento personal y académico. ¡Gracias padrinos, este logro también es suyo!*

*A todos mis tíos y primos a quienes los quiero mucho también y por su interés en mi progreso académico.*

## AGRADECIMIENTOS

Reconozco el gran apoyo de muchísimas personas a lo largo del doctorado sin el cual no hubiera alcanzado a emprender y concluir este proyecto. Agradezco en especial a:

- ❖ La UNAM, la Facultad de Medicina y el PECEM por permitirme formar parte de su orgullosa comunidad de universitarios. Muchas gracias a todo el comité del PECEM y a la Dra. Ana Flisser por hacer este programa posible y por su constante y siempre dispuesto apoyo cada semestre.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por beneficiarme con la beca número 624280 asignada a mi nombre y apoyar así mi desarrollo académico.
- ❖ La Dra. Nalú Navarro por aceptarme en su laboratorio como estudiante de doctorado y por su gran dedicación como tutora para poderme desenvolver y adquirir las habilidades indispensables de un investigador independiente.
- ❖ El Dr. David Kershenobich, el Dr. Mario Vilatobá, el Dr. Aldo Torre y la Dra. Christene Huang por enriquecer mis evaluaciones tutorales y por sus importantes aportaciones a los diferentes proyectos y publicaciones que hemos trabajado.
- ❖ El Dr. Mario Vilatobá y sus estudiantes de residencia y servicio social incluyendo la Dra. Sahara Hurtado y la Dra. Cynthia Martínez por haber empezado un biobanco con las muestras de los pacientes que reciben trasplante hepático en el INCMNSZ, el cual le dio un considerable impulso a este proyecto y una base para iniciar otros.
- ❖ Todo el Departamento de Gastroenterología del INCMNSZ y la valiosa ayuda tanto técnica como académica de sus investigadores incluyendo el Dr. Carlos Pérez, la MC. Sara Sixtos y la Lic. Alma Estanes, así como el apoyo incondicional que me proporcionaron día a día Pilar Cabrera, Ricardo Colin, y Georgina Aguilar.
- ❖ Todas mis compañeras del laboratorio, María José Lizardo, Nathaly Limón, Elisa Alatorre, Susana Yarza y Osvely Méndez y también a Farid Tejeda, de quienes yo aprendí mucho y quienes aportaron y participaron activamente en mi proyecto.
- ❖ Todos los pacientes que amablemente consintieron para que su muestra pudiera formar parte de estos análisis y contribuir al conocimiento científico.

## RESUMEN

La enfermedad hepática crónica y cirrosis constituyen un grave problema de salud en México. La cirrosis es caracterizada por una disrupción de la arquitectura hepática con el consecuente desarrollo de hipertensión portal debido a la fibrosis progresiva. El trasplante hepático es actualmente la única medida terapéutica definitiva para pacientes con estadios avanzados de cirrosis, incluyendo aquellos con cirrosis descompensada e insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF). Sin embargo, debido a la escasez de órganos, existe una gran necesidad de marcadores precisos que logren detectar a los pacientes en riesgo de progresar a cirrosis avanzada. La identificación de ciertos marcadores podría agilizar el tiempo en que el paciente recibe un trasplante e incluso podría ser de utilidad para estimar los posibles desenlaces si se decide realizar este procedimiento. La galectina-3 es una lectina de unión a  $\beta$ -galactósidos con amplia presencia y funciones en el cuerpo humano, destacando su papel en la inflamación y en la fibrosis. En el hígado, a pesar de su asociación con la fibrosis hepática, se desconoce hasta el momento su relevancia clínica y papel fisiopatológico con relación a la progresión de la enfermedad.

Por consiguiente, en este proyecto doctoral nos planteamos como hipótesis que la descompensación por cirrosis se asocia a una mayor expresión de galectina-3, siendo aún más evidente en ACLF, al ser responsable de una respuesta inflamatoria exacerbada y al participar en mecanismos relacionados con la desregulación transcripcional hepática y la disfunción del ciclo celular. Se analizó una cohorte ambispectiva de 235 pacientes que recibieron trasplante hepático ortotópico en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) entre el 2015 y 2019, los cuales fueron clasificados de acuerdo con su estadio de cirrosis. El primer paso consistió en realizar una revisión exhaustiva de los expedientes para conocer adecuadamente la población de estudio incluyendo sus características demográficas; gravedad de la enfermedad; su curso clínico con especial énfasis en aquellos con ACLF; el beneficio de recibir un trasplante hepático; y desenlaces del postrasplante. Estos resultados componen el análisis demográfico de la población de estudio en el que se basa esta tesis. Posteriormente se procedió al estudio experimental en el que se midió y evaluó la utilidad clínica de la galectina-3, utilizando muestras de hígado y sangre recolectadas al momento del trasplante. La expresión intrahepática de la galectina-3 se midió tanto por PCR cuantitativa como por inmunohistoquímica y aquella en la circulación mediante ELISA, con lo que se llevaron a cabo diferentes correlaciones clínicas para explorar su potencial como biomarcador.

Como primera parte de este proyecto, en la población de estudio se identificaron 95 pacientes que cumplían criterios de ACLF, 129 con cirrosis descompensada y 11 con cirrosis compensada. Se demostró que la supervivencia postrasplante entre los diferentes estadios de cirrosis fue similar al año y a los seis años ( $p= 0.60$  y  $p= 0.90$ , respectivamente), resaltando el beneficio de esta intervención incluso en ACLF. No obstante, estos últimos presentaron una estancia hospitalaria más prolongada ( $p= 0.01$ ) y una mayor frecuencia de complicaciones de tipo infeccioso ( $p < 0.01$ ). Conociendo el grupo de pacientes con ACLF que recibieron trasplante hepático, se estudió y comparó una cohorte adicional de aquellos que no fueron trasplantados ( $n= 67$ ). Encontramos que el curso clínico en aproximadamente la mitad de ellos se caracteriza

por la presencia de múltiples eventos de descompensación que cumplen criterios para esta entidad. Adicionalmente se identificaron determinantes que indican qué pacientes con ACLF se benefician más del trasplante, incluyendo una edad más joven; un score CLIF-C OF y CLIF-C ACLF más bajo en el evento inicial; un grado de ACLF 1 en el evento inicial y final; y la ausencia de fallas extrahepáticas. Esto se reflejó en una mortalidad significativamente incrementada a 30 días, 3 y 6 meses en aquellos que no pudieron ser sometidos al trasplante (43.3%, 65.7% y 77.6%, respectivamente) comparado con los que sí fueron trasplantados (0%, 3.2% y 4.2%), así como al año y a los 6 años (91.0% y 100% en los no trasplantados vs. 6.3% y 15.8% en aquellos trasplantados).

Habiendo caracterizado a los pacientes con ACLF, se procedió a evaluar la expresión sérica y hepática de galectina-3 de aquellos que dieron su consentimiento informado para el uso de sus muestras biológicas. De los 235 pacientes que recibieron trasplante entre el 2015 y 2019, se analizaron 9 con cirrosis compensada, 59 con cirrosis descompensada y 61 con ACLF. Como controles se usaron muestras del hígado de los donadores cadavéricos (n= 35) o suero de sujetos sanos dentro de la edad de los pacientes (n= 10). En apoyo a la medición de galectina-3 como un biomarcador importante en pacientes con cirrosis, se encontró una mayor expresión en la circulación (p= 0.007) e hígado (p< 0.0001) de aquellos con ACLF o cirrosis descompensada, es decir, en pacientes con cirrosis avanzada. Asimismo, galectina-3 correlacionó tanto con el MELD-Na como con indicadores de descompensación incluyendo la bilirrubina total y el INR y mostró además poder para discriminar entre cirrosis compensada y cirrosis avanzada (AUC= 0.78 y 0.84 para galectina-3 circulante e intrahepática, respectivamente [95% CI 0.66 – 0.89 y 0.72 – 0.95]; p< 0.01). Por inmunohistoquímica galectina-3 fue distintiva de cirrosis avanzada al ser positivos no solo los macrófagos sinusoidales, sino también los hepatocitos en los nódulos de regeneración e incluso las reacciones ductulares. Se observó una mayor expresión de marcadores de inflamación intrahepática (IL-6, MCP-1, IL-8 y M-CSF) en cirrosis avanzada, todos los cuales correlacionaron significativamente con galectina-3. En el pretrasplante, galectina-3 tuvo poder adicional para identificar pacientes que cursaron con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y por tanto aquellos con mayor urgencia de recibir un trasplante. Por otra parte, en el postrasplante mostró utilidad clínica al ser un predictor de complicaciones infecciosas durante la estancia inmediata posterior al procedimiento. Dichos análisis se corroboraron con datos de una cohorte externa de pacientes con hepatitis alcohólica, cuya muestra fue tomada al momento del diagnóstico, donde la abundancia intrahepática del ARN de galectina-3 mostró igualmente un patrón de mayor elevación en aquellos con enfermedad grave y correlacionó también con una mayor inflamación intrahepática.

Ampliando la relevancia de esta glicoproteína en los mecanismos de enfermedad propios de la cirrosis, se encontró que los pacientes con cirrosis avanzada (DC y ACLF) presentan además alteraciones importantes en la expresión de diferentes factores de transcripción hepáticos y en genes que controlan el ciclo celular. Galectina-3 intrahepática correlacionó significativamente con todos ellos: HNF1a (r= 0.25, p= 0.012), FOXA2 (r= 0.53, p< 0.0001) y CEBPa (r= 0.44, p< 0.0001) como factores de transcripción y CCND1 (r= 0.45, p< 0.0001), CCNB1 (r= 0.28, p= 0.009), p16 (r= 0.73, p< 0.0001) y Rb (r= 0.34, p= 0.001) como marcadores del ciclo celular.

Adicionalmente, se confirma un estado de senescencia en el hígado cirrótico el cual se asocia con la expresión de galectina-3 al haber hepatocitos y colangiocitos dobles positivos a esta lectina y p15/16 o p53.

Con base en los hallazgos antes mencionados, se puede concluir por un lado la importancia de agilizar el tiempo a trasplante de los pacientes con ACLF sabiendo que la supervivencia postrasplante es comparable con la del resto de pacientes con cirrosis y que su curso clínico es dinámico, pudiéndose complicar con el desarrollo de múltiples eventos de descompensación. Por otro lado, se concluye que la galectina-3 tiene potencial clínico importante, comportándose como una molécula con implicaciones fisiopatológicas en la cirrosis que refleja el grado de progresión. Si bien esta glicoproteína no difirió significativamente entre cirrosis descompensada y ACLF, demuestra poder en el pretrasplante para distinguir de manera general entre pacientes con cirrosis avanzada y aquellos con cirrosis compensada, ayudando a identificar pacientes que deben ser priorizados para recibir un trasplante. Toda esta evidencia coloca a la galectina-3 como un biomarcador de gravedad de la enfermedad, con utilidad en la predicción de desenlaces adversos en el postrasplante y con potencial relevancia como blanco terapéutico prometedor.

## ABSTRACT

Chronic liver disease and cirrhosis constitute a serious health problem in Mexico. Disruption of the normal hepatic architecture characterizes cirrhosis with consequent portal hypertension due to progressive fibrosis. Liver transplantation is currently the only definitive therapeutic measure for patients with advanced cirrhosis, including those with decompensated cirrhosis or acute-on-chronic liver failure (ACLF). However, given the scarcity of donor organs a great need exists for accurate markers that can help detect patients at risk of progressing to an advanced cirrhosis stage. The time a patient receives a liver transplant may be hastened by identifying certain markers that may even prove useful for the prediction of possible posttransplant outcomes. Galectin-3 is a  $\beta$ -galactoside binding lectin with broad presence and functions within the human body that strikes out as a molecule implied in inflammation and fibrosis. Within the liver, although galectin-3 expression relates to hepatic fibrosis, its clinical relevance as well as its pathophysiological role in relation to disease progression is currently uncertain.

Hence, in this doctoral thesis we defined as the working hypothesis that cirrhosis decompensation is associated with greater galectin-3 expression, which is even more evident in ACLF as it is responsible for an exacerbated inflammatory response and as it contributes to mechanisms related with deregulation of both liver-enriched transcription factors and the cell cycle. An ambispective cohort of 235 patients who underwent liver transplantation in the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) between 2015 and 2019 was analyzed. Patients were classified according to their cirrhosis stage. The first phase of this study consisted in carrying out an exhaustive revision of all medical records to adequately know the study population, including demographic characteristics, disease severity, clinical course with special emphasis in ACLF patients, liver transplant benefit, and posttransplant outcomes. These results make up the demographical analysis of the study population on which this thesis is based. Afterwards, the experimental part of the study was performed in which the clinical usefulness of galectin-3 was assessed by measuring liver and blood samples collected at the time of liver transplantation. Intrahepatic galectin-3 expression was measured by either quantitative PCR or immunohistochemistry and circulating galectin-3 expression by ELISA. Subsequently, different clinical correlations were carried out with these galectin-3 measurements to explore its potential as a biomarker.

As part of the first phase of this study, within the study population 95 patients that fulfilled ACLF criteria, 129 with decompensated cirrhosis and 11 with compensated cirrhosis were identified. Posttransplant survival at one and six years was found to be similar between the different stages of cirrhosis ( $p= 0.60$  and  $p= 0.90$ , respectively), which highlights the benefit of liver transplantation even in patients with ACLF. However, the latter presented a longer hospital stay ( $p= 0.01$ ) and a higher frequency of infectious complications ( $p < 0.01$ ). After characterizing the group of ACLF patients who received a liver transplant, an additional cohort of those who were not able to undergo this procedure were analyzed ( $n= 67$ ). We found that the clinical course in over half of all ACLF patients is distinguished by the development of multiple decompensation events that fulfill criteria for this entity. Furthermore, several potential determinants of low-risk mortality that may indicate liver transplant benefit in ACLF were identified, including a younger

age, a lower CLIF-C OF and CLIF-C ACLF scores at the initial ACLF event, an ACLF-1 grade at the initial and final ACLF event, and the absence of extrahepatic failures. This was reflected in significantly higher 30-day, 3- and 6-month mortalities in non-LT patients (42.3%, 65.7% and 77.6%, respectively) compared to the LT group (0%, 3.2% and 4.2%), as well as higher mortality after 1 and 6 years (91.5% and 100% in non-LT patients vs. 6.3% and 15.8% in LT patients, respectively).

Once all patients with ACLF were identified and evaluated, circulating and hepatic galectin-3 expression was then measured in the samples of those who gave written informed consent. Out of the 235 patients who received a liver transplant between 2015 and 2019, 9 patients with compensated cirrhosis, 59 with decompensated cirrhosis and 61 with ACLF were included in these analyses. As controls, liver samples from the deceased donors (n= 35) or serum from healthy subjects within the patient's age group (n= 10) were used. In support of the measurement of galectin-3 as a relevant biomarker in cirrhotic patients, increased circulating ( $p= 0.007$ ) and hepatic ( $p< 0.0001$ ) galectin-3 levels were found in those with ACLF or decompensated cirrhosis, that is, in patients with advanced cirrhosis. Moreover, galectin-3 correlated both with the MELD-Na and with disease severity parameters including total bilirubin and INR and had significant discriminating power to distinguish between compensated and advanced cirrhosis (AUC= 0.78 and 0.84 for circulating and intrahepatic galectin-3, respectively [95% CI 0.66 – 0.89 and 0.72 – 0.95];  $p< 0.01$ ). Immunohistochemistry analyses revealed a specific galectin-3 staining pattern in patients with advanced cirrhosis, where positivity was not only observed in sinusoidal macrophages but also in hepatocytes within regenerative nodules and even in ductular reactions. Patients with advanced cirrhosis showed a higher expression of intrahepatic inflammatory markers (IL-6, MCP-1, IL-8, and M-CSF), all of which correlated significantly with galectin-3. In the pretransplant setting, galectin-3 had additional power to identify patients with systemic inflammatory response syndrome and thus those with a higher urgency for a liver transplant. Furthermore, in the posttransplant setting it also showed clinical utility as a significant predictor for infectious complications that develop during the immediate hospital stay following the procedure. These analyses were corroborated with data from an external cohort of patients with alcoholic hepatitis, whose sample was taken at the time of diagnosis, where intrahepatic galectin-3 RNA abundance was more elevated in those with severe disease and further correlated with increased intrahepatic inflammation.

To better understand the relevance of this glycoprotein in specific disease mechanisms of cirrhosis, it was found that patients with advanced cirrhosis (DC and ACLF) additionally present important alterations in the expression of different liver-enriched transcription factors and of cell cycle checkpoints. Intrahepatic galectin-3 correlated significantly with all of them: HNF1a ( $r= 0.25$ ,  $p= 0.012$ ), FOXA2 ( $r= 0.53$ ,  $p< 0.0001$ ) and CEBPa ( $r= 0.44$ ,  $p< 0.0001$ ) as transcription factors and CCND1 ( $r= 0.45$ ,  $p< 0.0001$ ), CCNB1 ( $r= 0.28$ ,  $p= 0.009$ ), p16 ( $r= 0.73$ ,  $p< 0.0001$ ) and Rb ( $r= 0.34$ ,  $p= 0.001$ ) as cell cycle markers. Moreover, senescence is confirmed as a relevant phenomenon in the cirrhotic liver and was found to correlate with galectin-3 expression given the double positivity for this lectin and p15/16 or p53 in hepatocytes and cholangiocytes.

According to the findings previously mentioned, it can be concluded on the one hand the importance of hastening the time to transplant in patients who have been diagnosed with ACLF, knowing that their posttransplant survival is similar to that of other patients with cirrhosis and that their clinical course is dynamic which may worsen with the development of multiple decompensation events. On the other hand, galectin-3 has important clinical utility as a molecule with pathophysiological implications in cirrhosis that reflects the degree of disease progression. Even though this glycoprotein did not distinguish between decompensated cirrhosis and ACLF, it shows overall power to discriminate between advanced and compensated cirrhosis in the pretransplant period and therefore patients who should be prioritized in the liver transplant waiting list. All this evidence places galectin-3 as a disease severity biomarker that is useful in the prediction of adverse posttransplant outcomes and with potential relevance as a promising therapeutic target.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS . . . . .	I
RESUMEN . . . . .	II
ABSTRACT . . . . .	V

## 1. MARCO TEÓRICO

1.1 El hígado . . . . .	1
1.2 Enfermedad hepática crónica y cirrosis . . . . .	3
1.3 Epidemiología . . . . .	6
1.4 Insuficiencia hepática aguda sobre crónica	
1.4.1 Definición y relevancia de acuerdo con el estudio CANONIC . . . . .	8
1.4.2 Criterios diagnósticos . . . . .	8
1.4.3 Características fisiopatológicas de la ACLF. . . . .	10
1.4.4 Curso y manejo clínico de la ACLF. . . . .	13
1.5 Galectina-3	
1.5.1 La galectina-3 como molécula única entre las lectinas . . . . .	16
1.5.2 Descubrimiento de Mac-2 (galectina-3) como molécula fisiopatológicamente relevante . . . . .	16
1.5.3 Localización y funciones de la galectina-3 . . . . .	17
1.5.4 La galectina-3 como mediador inflamatorio . . . . .	18
1.5.5 La galectina-3 en la enfermedad hepática . . . . .	20

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Definición del problema . . . . .	23
2.2 Hipótesis . . . . .	23
2.3 Objetivos . . . . .	23
2.4 Diseño del estudio . . . . .	24

## **2.5 Criterios de selección**

<b>2.5.1 Criterios de inclusión</b>	24
-------------------------------------	----

<b>2.5.2 Criterios de exclusión</b>	24
-------------------------------------	----

<b>2.5.3 Criterios de eliminación</b>	25
---------------------------------------	----

<b>2.6 Variables y desenlaces</b>	27
-----------------------------------	----

## **3. METODOLOGÍA**

### **3.1 Pacientes y recolección de datos clínicos y bioquímicos**

<b>3.1.1 Criterios diagnósticos de ACLF y clasificación de la gravedad</b>	33
--	----

<b>3.1.2 Descripción de las poblaciones de ACLF y determinación de los eventos de ACLF</b>	33
--	----

<b>3.2 Muestras biológicas</b>	36
--------------------------------	----

<b>3.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)</b>	36
--	----

<b>3.4 Extracción de ARN y análisis de expresión génica</b>	36
---	----

<b>3.5 Inmunohistoquímica y cuantificación de galectina-3</b>	38
---	----

<b>3.6 Recolección de datos clínicos y bioquímicos y definiciones</b>	39
---	----

<b>3.7 Análisis estadísticos</b>	39
----------------------------------	----

## **4. RESULTADOS GENERALES**

### **4.1 El trasplante hepático es benéfico independientemente del estadio de cirrosis o el grado de insuficiencia hepática aguda sobre crónica**

<b>4.1.1 Características de pacientes con ACLF trasplantados y no trasplantados</b>	41
---	----

<b>4.1.2 Los pacientes con ACLF tienen una estancia más complicada en el periodo postrasplante, pero una supervivencia comparable a corto y largo plazo</b>	46
---	----

<b>4.1.3 Discusión</b>	50
------------------------	----

### **4.2 Diferencias clínicas en el evento inicial de insuficiencia hepática aguda sobre crónica distinguen a pacientes con mayor beneficio del trasplante hepático**

<b>4.2.1 Características de dos poblaciones distintas de pacientes con ACLF: trasplantados y no trasplantados</b>	52
---	----

4.2.2	<u>Durante su curso clínico, los pacientes con ACLF pueden desarrollar múltiples eventos de ACLF y con diferente gravedad de la enfermedad</u>	55
4.2.3	<u>Los pacientes con ACLF que sobreviven o no hasta ser trasplantados desarrollan diferentes tipos de fallas orgánicas antes de su desenlace .</u>	57
4.2.4	<u>Diferencias en la mortalidad posterior al primer evento de ACLF distinguen adicionalmente a los pacientes con ACLF que se benefician del trasplante hepático.</u>	59
4.2.5	<u>Discusión</u>	62

### **4.3 La galectina-3 se encuentra sobre-expresada en pacientes con cirrosis avanzada y predice complicaciones infecciosas posteriores al trasplante hepático**

4.3.1	<u>Características demográficas de los pacientes analizados</u>	66
4.3.2	<u>Niveles de galectina-3 sistémicos discriminan cirrosis avanzada y correlacionan con la gravedad de la enfermedad hepática</u>	68
4.3.3	<u>La expresión hepática de galectina-3 discrimina a pacientes con cirrosis avanzada y correlaciona con la gravedad de la enfermedad y la inflamación intrahepática</u>	70
4.3.4	<u>La inmunotinción positiva de galectina-3 en los hepatocitos es característica en pacientes con cirrosis avanzada</u>	74
4.3.5	<u>Se confirma una elevada expresión de galectina-3 intrahepática en una cohorte externa de pacientes con hepatitis alcohólica grave</u>	74
4.3.6	<u>La evaluación pretrasplante de la galectina-3 sistémica ayuda a predecir complicaciones infecciosas en el periodo postrasplante</u>	78
4.3.7	<u>Discusión</u>	82

### **4.4 Discusión: Resultados generales**

## **5. RESULTADOS ADICIONALES**

### **5.1 Los principales factores de transcripción enriquecidos en el hígado se encuentran alterados en los diferentes estadios de cirrosis y correlacionan con la expresión intrahepática de galectina-3**

5.1.1	<u>En cirrosis, HNF4a es regulado a la baja mientras que HNF1a, CEBPa y FOXA2 al alta, encontrando correlaciones con parámetros de descompensación hepática.</u>	89
-------	--	----

5.1.2	<u>Galectina-3 correlaciona intrahepáticamente con factores de transcripción enriquecidos en el hígado que se encuentran alterados en el paciente cirrótico</u>	92
5.2	<b>Marcadores de la progresión o arresto del ciclo celular en el hígado se encuentran diferencialmente expresados de acuerdo con el estadio de cirrosis, revelan un importante grado de senescencia y correlacionan con la expresión intrahepática de galectina-3</b>	
5.2.1	<u>La expresión intrahepática de CCND1, Rb y p16 es mayor en pacientes con cirrosis y se asocia con el MELD-Na</u>	94
5.2.2	<u>La expresión intrahepática de galectina-3 correlaciona fuertemente con el marcador de arresto celular p16</u>	94
5.2.3	<u>La ausencia de Ki-67 y una alta expresión de los inhibidores p15/16 y p53 aunado a una doble positividad con galectina-3 caracterizan histológicamente al hígado cirrótico</u>	97
5.3	<b>Discusión: Resultados adicionales</b>	100
6.	<b>LIMITACIONES, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	104
7.	<b>OTROS MANUSCRITOS</b>	107
8.	<b>RECONOCIMIENTOS</b>	113
9.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	116
10.	<b>ANEXOS</b>	125

## ABREVIACIONES GENERALES

**ACLF**, insuficiencia hepática aguda sobre crónica. **AH**, hepatitis alcohólica. **CC**, cirrosis compensada. **DC**, cirrosis descompensada. **IQR**, rango intercuartil. **OF**, falla orgánica. **ROC**, *receiver operating characteristic curve*. **RNAseq**, secuenciación de ARN. **SIRS**, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

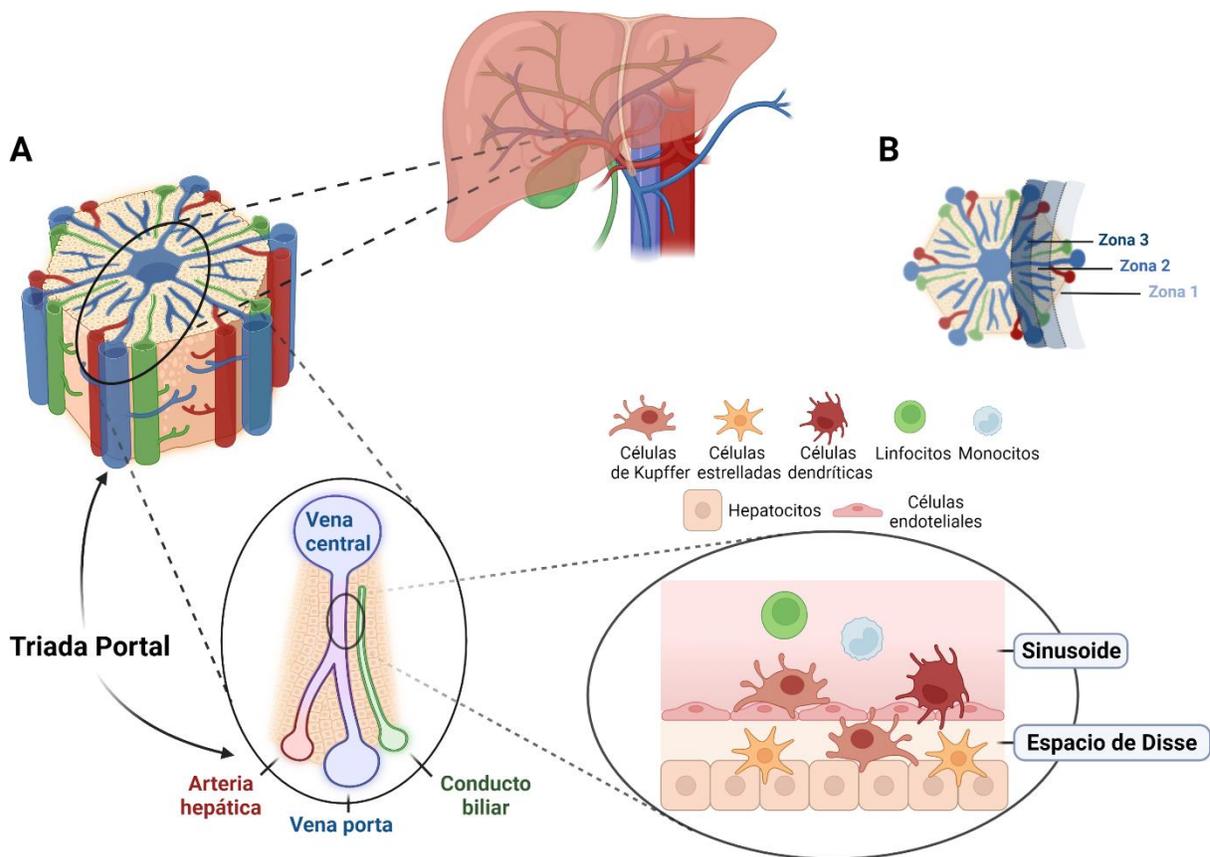
# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 EL HÍGADO

El hígado es un órgano con funciones primordiales en las áreas de metabolismo, detoxificación y síntesis. Anatómicamente, es el órgano interno más grande del cuerpo humano, con un peso aproximado de 1500 gramos. Se encuentra debajo del diafragma en la porción superior derecha de la cavidad abdominal y se compone de un lóbulo derecho y uno izquierdo, siendo el lóbulo derecho el más grande al ocupar 60 a 70% de la masa hepática. A diferencia de otros órganos, el hígado tiene una doble fuente de irrigación sanguínea, donde el mayor aporte proviene de la vena porta (~75%) la cual contiene los nutrientes absorbidos por el sistema digestivo, y el resto lo provee la arteria hepática (~25%) (1). Ramas de estos vasos sanguíneos se distribuyen junto con conductos biliares y vasos linfáticos en agregados de tejido conectivo conocidos como triadas portales, las cuales dan origen a los sinusoides hepáticos que corren de manera radial a lo largo de cordones de hepatocitos y desembocan en una vena central (vénula hepática terminal).

De esta manera, la unidad estructural del hígado es el lobulillo hepático que consiste en cordones de hepatocitos distribuidos en forma de hexágono, cuyos vértices están compuestos por triadas portales y en el centro se localiza la vena central; se estima que el hígado humano contiene aproximadamente un millón de lobulillos (2, 3). Por otro lado, debido a los diferentes gradientes de oxigenación y perfusión en el lobulillo que ocurren si los hepatocitos están situados más cerca de la triada portal o de la vena central, se describe también una unidad funcional llamada acino. Los acinos hepáticos tienen forma elíptica y establecen la zonación metabólica de los lobulillos, la cual explica la manera diferencial como se ven afectados los hepatocitos ante insultos tóxicos e isquémicos (2).

En los espacios perisinusoidales (espacios de Disse), entre el endotelio fenestrado de los sinusoides y los hepatocitos, se encuentran las dos principales células no parenquimatosas del hígado: las células estrelladas y los macrófagos hepáticos (4). Estos últimos son conocidos como células de Kupffer y su función es vital manteniendo control de la sangre rica en antígenos que proviene del intestino. Asimismo, las células de Kupffer conforman el 80 a 90% de todos los macrófagos en el cuerpo humano, resaltando el hecho que el hígado juega un papel activo en el sistema inmunológico, ya que también sintetiza una gran parte de las proteínas involucradas en las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas (5-7). El resto de las células no parenquimatosas del hígado incluyen los colangiocitos (células epiteliales que revisten los conductos biliares) y leucocitos incluyendo linfocitos, granulocitos y células dendríticas que participan también en el proceso de vigilancia inmunológica. En conjunto, este grupo de células constituye el 40% de la masa celular hepática total (1). Su importancia en el sostenimiento de la función hepática se refleja en la magnitud de los cambios tanto locales como sistémicos que ocurren a consecuencia de la lesión aguda y crónica.



**Figura 1. El hígado.** Siendo el órgano interno más grande del cuerpo humano, el hígado tiene como unidad estructural el lobulillo hepático cuya forma es hexagonal (A). En cada vértice de este hexágono se encuentra una triada portal conformada por ramas de la arteria hepática y de la vena porta así como por conductos biliares. La sangre de estos vasos corre de manera radial a lo largo de cordones de hepatocitos en sinusoides que desembocan en una vena central. Entre el endotelio fenestrado de los sinusoides y los cordones de hepatocitos se encuentra un espacio perisinusoidal (espacio de Disse) en donde se pueden encontrar las células estrelladas y los macrófagos hepáticos (células de Kupffer). La unidad funcional del hígado es el acino hepático (B) que de acuerdo con los gradientes de oxigenación y perfusión establece la zonación metabólica de los lobulillos.

Creado con BioRender.com

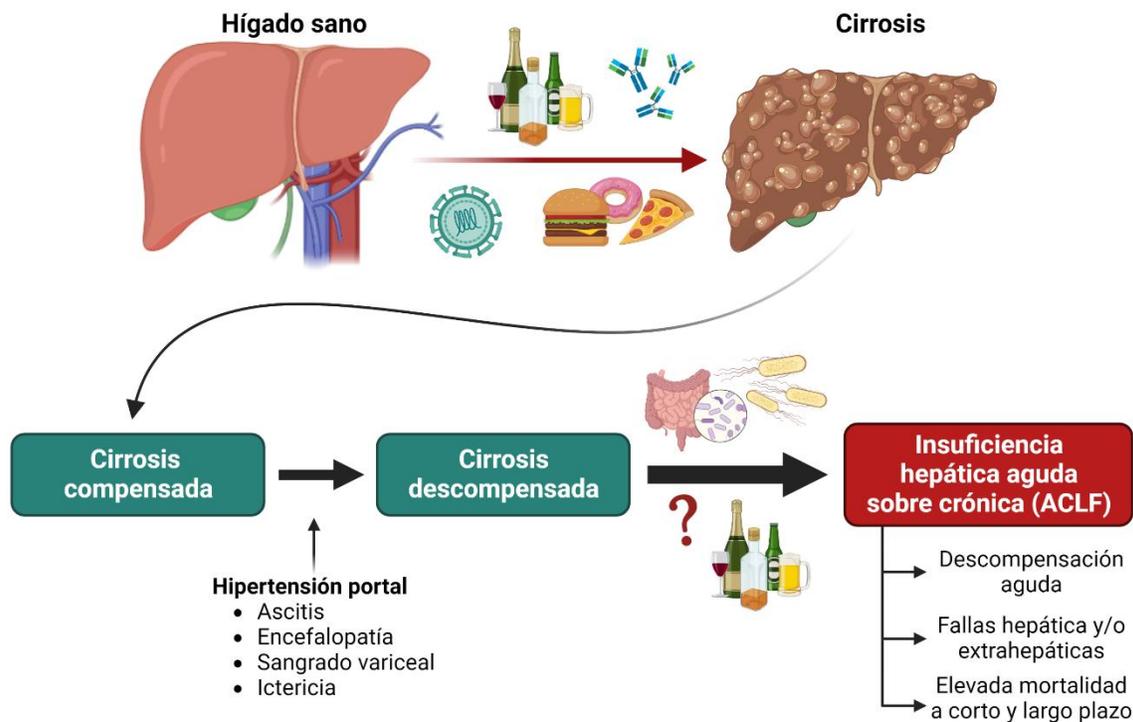
## 1.2 ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA Y CIRROSIS

El hígado puede ser afectado por una gama amplia de agentes biológicos y no biológicos, algunos de los cuales pueden conllevar a enfermedad hepática crónica, siendo las causas principales la infección por los virus C y B, la enfermedad hepática alcohólica, y la esteatohepatitis no alcohólica (8, 9). Asimismo, alteraciones metabólicas, la autoinmunidad, y procesos que afecten el sistema biliar y la eliminación de bilis son otras causas importantes de enfermedad crónica a considerar (8). Como consecuencia de un insulto crónico o persistente, el hígado puede progresar a una fase avanzada de enfermedad llamada cirrosis, que se define como una distorsión histológicamente evidente de la arquitectura hepática normal, caracterizada por nódulos de regeneración que se rodean por septos fibrosos con alteraciones consecuentes del parénquima hepático y su vasculatura (4). La cirrosis también se puede describir como el grado más avanzado de fibrosis hepática, que fisiopatológicamente resulta de inflamación, activación y proliferación de las células estrelladas, todo lo cual redundando en una respuesta de reparación tisular anormal que perpetúa la producción y depósito de tejido conectivo. Esto resulta en un proceso llamado capilarización sinusoidal, en la que tejido de granulación ocupa los espacios de Disse ocasionando la pérdida de las fenestraciones endoteliales. Dada la distorsión de la vasculatura hepática normal, ocurre un cortocircuito directo de la sangre tanto portal como arterial a las venas centrales, lo que compromete el intercambio metabólico entre el parénquima adyacente y los sinusoides.

Debido a los cambios patológicos descritos, se explican varias alteraciones fisiológicas. Estas se pueden clasificar en procesos que modifican las funciones normales del hepatocito (ocasionado insuficiencia hepática); anomalías circulatorias sistémicas a causa de la resistencia intrahepática incrementada, incluyendo hipertensión portal; y alteraciones que favorecen el origen de hepatocarcinoma celular (4). En muchos casos, los pacientes con enfermedad hepática son asintomáticos y los signos clínicos típicos no son evidentes (8, 9). Sin embargo, su historia natural consiste en varias fases. La primera es el estado de enfermedad hepática crónica, tras el cual el hígado sufre los cambios mencionados que originan la cirrosis. En su inicio se denomina cirrosis compensada y corresponde al estado donde el insulto hepático no es lo suficientemente grave para manifestarse clínicamente; esto explica que su mortalidad sea relativamente baja (supervivencia media mayor a 12 años). Con la progresión e intensificación de la disfunción hepatocítica y la aparición de hipertensión portal, se desarrolla una fase de progresión rápida llamada cirrosis descompensada, que se describe por varias características clínicas particulares incluyendo ictericia, ascitis, esplenomegalia, encefalopatía, asterixis, y alteraciones vasculares como telangiectasias y várices abdominales. El diagnóstico oportuno en estos pacientes es de gran relevancia, ya que la supervivencia es menor o igual a 2 años. De interés, la mitad de los pacientes con cirrosis compensada progresan a la descompensación en un periodo de tiempo aproximado de 6 años (o bien, una tasa de transición de 5 a 7% por año) (10). Como se describirá en las siguientes secciones, este paradigma ha sido modificado con el consenso sobre el estado de insuficiencia hepática aguda sobre crónica.

Las complicaciones típicas del paciente cirrótico se explican en gran parte por la hipertensión portal, un fenómeno único a esta enfermedad. La hemodinámica alterada en la cirrosis activa respuestas compensatorias para lograr mantener la circulación sistémica, la primera de las cuales es la vasodilatación esplácnica; un ejemplo de su manifestación es la esplenomegalia, que como consecuencia ocasiona también el secuestro de plaquetas y otras células sanguíneas. Adicionalmente, varios de los vasos sanguíneos que drenan en el sistema porta hacen cortocircuitos fuera de este, creando colaterales portosistémicas en un intento fútil para contrarrestar la presión venosa incrementada. Esto conlleva de manera importante a la acumulación sistémica de amonio debido a que una gran cantidad de sangre proveniente del intestino escapa del hígado por estos cortocircuitos, lo que es causa de encefalopatía. Una paradoja interesante es que mientras la vasodilatación esplácnica es sostenida por la producción exagerada de óxido nítrico, existe una deficiencia en su producción en el hígado cirrótico, lo que ocasiona vasoconstricción intrahepática que contribuye junto con la fibrosis del parénquima a la hipertensión portal. (8)

El resultado final de esta cadena de eventos es un decremento en el volumen arterial sistémico efectivo. Como respuesta a esta alteración fisiopatológica, el organismo activa sistemas neurohormonales, principalmente el sistema renina-angiotensina-aldosterona, lo que conlleva a complicaciones adicionales: retención de sodio, circulación hiperdinámica, y vasoconstricción de algunos sistemas vasculares (de manera más importante el renal). En estados avanzados de cirrosis puede haber un impacto multisistémico con el advenimiento de los síndromes hepatorenal, hepatopulmonar y/o cardiomiopatía cirrótica, con un incremento correspondiente de mortalidad. En estos casos, la tasa de mortalidad al año es de 57% de acuerdo con una revisión sistemática, comparada con aquella de 20% en pacientes con cirrosis descompensada que solo cursan con ascitis, con o sin várices esofágicas no hemorrágicas; 3.4% en aquellos con cirrosis compensada con várices; y 1% en aquellos con cirrosis compensada sin várices (10).



**Figura 2. Enfermedad hepática crónica y cirrosis.** Ante un insulto crónico o persistente a causa de diferentes factores, como puede ser el consumo excesivo de alcohol, la infección por los virus C y B, el síndrome metabólico y la autoinmunidad, el hígado puede progresar a un estado de enfermedad llamado cirrosis que se caracteriza por fibrosis con distorsión del parénquima hepático y su vasculatura. Esta comienza inicialmente como una cirrosis compensada y tras la aparición de hipertensión portal y síntomas relacionados, avanza a la fase de cirrosis descompensada. Ampliando este concepto, se reconoce ahora una fase llamada insuficiencia hepática aguda sobre crónica, o ACLF por sus siglas en inglés, que puede ocurrir en el paciente cirrótico tras un evento de descompensación aguda antecedido por diversos precipitantes, como son infecciones, el alcohol o con alta frecuencia también factores desconocidos. El estado de ACLF se caracteriza además por el desarrollo de fallas hepática y/o extrahepáticas y en asociación una elevada mortalidad a corto y largo plazo.

Creado con BioRender.com

### 1.3 EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad hepática crónica y cirrosis han destacado continuamente como un problema mundial de salud, en parte debido a su comportamiento asintomático inicial y al hecho que las medidas terapéuticas permanecen limitadas. El número de personas viviendo con cirrosis es difícil de estimar puesto que una gran mayoría no manifiesta síntomas o signos en la fase temprana, sin embargo, se calcula que la prevalencia mundial es de 25 a 400 casos por cada 100,000 sujetos y en específico, aproximadamente 112 millones de casos de cirrosis compensada y 10.6 millones de cirrosis descompensada (8, 11). De acuerdo con los estimados más recientes de salud global publicados por la Organización Mundial de la Salud (2016), la enfermedad hepática crónica y cirrosis se ubican dentro de las 20 principales causas de mortalidad, específicamente en el lugar 11, y se le atribuyen un 2.2% del total de muertes lo que corresponde a un estimado de 16.8 muertes por cada 100,000 de población mundial (12). El proyecto multinacional *Global Burden of Disease* (GBD, carga global de salud) ha mostrado también que las muertes por cirrosis incrementaron mundialmente en un 10.3% de 2005 a 2015, sin embargo, al ajustarse la tasa de mortalidad por edad se encuentra realmente una disminución del 13.1%, lo que refleja por ejemplo los esfuerzos por reducir los casos de hepatitis B por medio de programas extensos de vacunación, y también la existencia de antivirales novedosos de acción directa contra el virus de hepatitis C (13).

En México, la guía de práctica clínica sobre insuficiencia hepática (2008) menciona que en nuestro país existen aproximadamente entre 100,000 y 200,000 pacientes cirróticos, mientras que un estudio más reciente señala una prevalencia aproximada de 2,500 a 2,750 casos y de 225 a 250 por cada 100,000 sujetos de cirrosis compensada y descompensada, respectivamente (11, 14). De esta manera, México es uno de los países donde la enfermedad hepática y cirrosis son actualmente un problema de salud mayor que el promedio mundial. De acuerdo con datos poblacionales pre-pandemia del 2018, las enfermedades del hígado ocupaban el cuarto lugar como causa principal de muerte (5.4% del total de muertes), y específicamente el quinto lugar (7.1%) en hombres y el séptimo (3.4%) en mujeres (15). Una actualización de estos datos muestra que en el 2021 la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) y la influenza y neumonía se colocaron en el segundo y quinto lugar como causas principales de muerte en México a consecuencia de la pandemia, desplazando así las enfermedades del hígado al sexto lugar (16). Desde el 2009 la tasa de defunciones ocasionadas por esta patología por cada 10,000 habitantes ha sido entre 2.8 y 3.2 (15). Resaltando su relevancia como problema de salud, la cirrosis ocurre principalmente en la edad productiva, a la que cada vez se aproxima el promedio de la población global. En efecto, en México la cirrosis se vuelve más frecuente en personas mayores de 25 años, y continúa siendo relevante en gente igual o mayor a 65 años al ocupar el octavo lugar como causa principal de muerte. Es en este grupo de edad donde también se registran el mayor número de muertes por cirrosis (38.3%). (15)

Según el GBD, desde el 2005 las causas más frecuentes de cirrosis en el mundo son, en orden, la infección por el virus de hepatitis B, el alcohol y la infección por el virus de hepatitis C, ocasionando 5.4, 5.0, y 5.8 muertes, respectivamente, por cada 100,000 habitantes en el 2015

(13). En nuestro país, la cirrosis alcohólica es la etiología más importante, a la que se le atribuyen el 35.5% del total de defunciones por enfermedad hepática. En el siguiente lugar de frecuencia se encuentra la cirrosis por virus de hepatitis C, sin embargo, esta etiología constituye el principal motivo de solicitud de trasplante hepático (15-17).

Por otro lado, los años de vida saludable perdidos (AVISA, o DALYs por sus siglas en inglés para *Disability-Adjusted Life Years*) es un indicador demográfico relevante considerando que la enfermedad hepática crónica y cirrosis conllevan a muerte prematura. Esta ocupa el lugar 15 dentro de las 20 principales causas mundiales y acumula 607 AVISA por cada 100,000 habitantes (18). En específico, los años de vida que se pierden por muertes prematuras (APMP, o YLLs por sus siglas en inglés para *Years of Life Lost*) es uno de los dos componentes de los AVISA. Este otro indicador ha mostrado un incremento en los últimos años, puesto que en el 2016 los APMP por cirrosis subieron a la posición 12 desde la 16 que ocupaba en el 2000, contribuyendo con 586 por cada 100,000 sujetos de la población mundial. No obstante, se registra un mayor número de APMP por cirrosis en la región de América, donde ocupa el lugar 10, y también en la región Europea, donde se encuentra en el lugar 5 (19, 20). Como se explicó anteriormente, en México la enfermedad hepática crónica y cirrosis son un problema de salud mayor y constituyen la 4ta causa más importante de AVISA, lo que representa el 4.1% del total en nuestro país; el 46% de esta carga se asocia con la hepatitis alcohólica y un 35% con la infección por el virus de hepatitis C (21). Lo anterior es también evidente en el reporte del GBD, donde México es el único país de Latinoamérica que presenta la cirrosis alcohólica como una de las diez principales causas de APMP (ocupando el lugar 10). Aún más impactante, estos APMP observados exceden 3 veces los APMP que se esperarían si se ajusta por el índice sociodemográfico del país (13).

Las proyecciones de la Organización Mundial de la Salud sobre las 20 causas más importantes de mortalidad que se encontrarán en el 2030 mantienen que la cirrosis continuará siendo un problema mundial de salud y ocupará el lugar 11, causando 14 muertes por cada 100,000 sujetos de población mundial (22). Para el 2045 se espera un incremento y ocupará el lugar 9 de mortalidad, aunque podrá disminuir al lugar 10 para el 2060. Específicamente, en la región de América se estima que la cirrosis tendrá un aumento en el 2030 (posición 9) y será desplazada a la posición 13 conforme incrementen las muertes relacionadas principalmente con cáncer. (22)

## 1.4 INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA SOBRE CRÓNICA

### 1.4.1 Definición y relevancia de acuerdo con el estudio CANONIC

El espectro clínico de la cirrosis hepática ha sido ampliado recientemente para incluir una entidad cuyo grado de progresión y mortalidad es aún mayor que aquel de la cirrosis descompensada, concretamente la insuficiencia hepática aguda sobre crónica o ACLF por sus siglas en inglés (*acute on chronic liver failure*). Su primera mención en la literatura fue en 1995 cuando iniciaron los primeros ensayos clínicos que evaluaban el uso de máquinas extracorpóreas para diálisis hepática, incluyendo la máquina MARS (*Molecular Adsorbent Recirculating System*) (23-25). Asimismo, había sido descrita de manera discordante tanto por la Asociación Asiática del Pacífico para el Estudio del Hígado (APASL) como por la Asociación Europea para el Estudio de la Enfermedad Hepática (EASL) hasta que el Congreso Mundial de Gastroenterología desarrolló una definición en 2014 que buscó unificar los diversos criterios que se tenían al momento. Esta menciona que ACLF es un síndrome en pacientes con enfermedad hepática crónica, con o sin cirrosis previamente diagnosticada, caracterizado por descompensación aguda, lo que resulta en falla hepática (ictericia y prolongación del INR) y una o más fallas orgánicas extrahepáticas, asociado con una mortalidad incrementada a corto y a largo plazo (26).

El interés por conocer y caracterizar a la población de pacientes que desarrollan esta forma de cirrosis conllevó al estudio de cohorte prospectivo, multicéntrico CANONIC (*Chronic Liver Failure Acute-on-Chronic Liver Failure in Cirrhosis*) que efectuó la asociación europea en el 2013, siguiendo a una población total de 1343 pacientes hospitalizados por descompensación aguda de cirrosis en 29 hospitales de 8 países europeos (27). La prevalencia de ACLF encontrada por este estudio fue de 30.9% y se determinó que la mortalidad a corto plazo (dentro de los primeros 28 días) es 15 veces mayor, siendo la falla orgánica múltiple sin shock séptico o hipovolémico la causa principal de muerte. De manera interesante, se identificó que la ACLF es una entidad independiente a la cirrosis descompensada, no solo por la mayor mortalidad y por la tendencia a desarrollar falla multiorgánica, sino también porque la población de pacientes con ACLF fue más joven, la prevalencia de infección por virus C era menor y en cambio la presencia de alcoholismo activo e infecciones bacterianas como potenciales precipitantes de descompensación era mayor. (27)

### 1.4.2 Criterios diagnósticos

Una contribución importante del estudio CANONIC fue la creación de los criterios diagnósticos con los que se clasifican los pacientes con ACLF en diferentes grados de mortalidad y gravedad de la enfermedad. Esto se resume en el score CLIF-C OF (*Chronic Liver Failure-Consortium Organ Failure*), diseñado por los autores de dicho estudio, que categoriza a los pacientes en ACLF grado 1, 2 o 3 de acuerdo con la presencia de 1, 2 o 3 o más de las seis posibles fallas orgánicas (hepática, renal, cerebral, coagulación, circulación y pulmonar), según determinados valores de laboratorio y clínicos. De esta manera, cada grado corresponde también a una tasa de mortalidad progresivamente mayor (22%, 32% y 73%, respectivamente, comparado con la mortalidad de 4.9% en pacientes sin ACLF) (28). Sorprendentemente, la falla hepática aislada (definida como un nivel de bilirrubina mayor a 12 mg/dL) no es suficiente para

hacer el diagnóstico de ACLF, ni tampoco la falla cerebral (presencia de encefalopatía grado 3 a 4), de coagulación, circulatoria o pulmonar aislada. El único criterio que sí puede determinar ACLF (grado I) es la presencia de un nivel de creatinina mayor a 2 mg/dL, lo que se considera falla renal. El estudio CANONIC determinó que el resto de las fallas orgánicas se deben acompañar juntas, o con disfunción renal (creatinina de 1.5 a 1.9 mg/dL) y/o encefalopatía grado 1 a 2, para poder establecer dicho diagnóstico (27, 28).

	Criterio clínico de disfunción	Criterio clínico de falla
<b>Hepática</b>	-	Bilirrubina total > 12mg/dL
<b>Renal</b>	Creatinina ≥ 1.5–1.9 mg/dL	Creatinina ≥ 2 mg/dL
<b>Cerebral</b>	Encefalopatía grado 1 o 2 de acuerdo con los criterios de West-Haven	Encefalopatía grado 3 o 4 de acuerdo con los criterios de West-Haven
<b>Coagulación</b>	-	INR ≥ 2.5
<b>Circulatoria</b>	-	Uso de vasopresores
<b>Pulmonar</b>	-	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ≤ 200, o SpO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ≤ 214 o ventilación mecánica

**Sin ACLF**

- No presenta fallas orgánicas (OF).
- OF única que no involucra la renal y sin disfunción renal o cerebral.

**ACLF-1**

- OF renal única.
- OF hepática, cerebral, de la coagulación, circulatoria o pulmonar única, en asociación con disfunción renal y/o hepática.

**ACLF-2**

- 2 OFs en cualquier tipo de combinación.

**ACLF-3**

- 3 o más OFs en cualquier tipo de combinación.

**Figura 3. Criterios diagnósticos de insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF)**

OF= falla orgánica

### 1.4.3 Características fisiopatológicas de la ACLF

Aunque el objetivo principal del estudio CANONIC no fue analizar aspectos relacionados con la fisiopatología, estos datos sugerían enfáticamente que el componente principal de la ACLF es una respuesta inflamatoria sistémica exacerbada. Por un lado, los pacientes que cumplían con el diagnóstico de ACLF mostraban datos consistentes con una cuenta elevada de leucocitos y niveles séricos elevados de proteína C reactiva (27). De manera interesante, el grado de reacción inflamatoria interpretada de acuerdo con los niveles de estos dos parámetros fue uno de los dos factores identificados que predicen mortalidad y desarrollo de ACLF. El otro factor fue el hecho de tener o no historia previa de episodios de descompensación aguda, ya que aquellos que no la tienen presentaron un curso de enfermedad más grave y de mayor mortalidad. Contrario a lo esperado, la presencia o ausencia de algún factor precipitante (infección bacteriana, alcohol, hemorragia gastrointestinal) no estuvo relacionado con el grado de enfermedad o la mortalidad, y de hecho en la mayoría de los pacientes con ACLF (43%) no se logró identificar precipitante alguno. Los autores sugirieron al respecto que varios eventos precipitantes no reconocidos se pueden deber a la liberación de patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, también llamados alarminas) que pueden ser resultado de traslocación bacteriana o lesión tisular, respectivamente, y causar lo que se denomina inflamación estéril. (27)

A partir del estudio CANONIC, estudios subsecuentes han continuado apoyando la teoría de que la ACLF es una inmunopatología como resultado de un exceso de inflamación que ocasiona daño tisular colateral, e incluso fallas orgánicas. El equipo de Solé y colaboradores, por ejemplo, encontraron que existe un patrón diferencial de citocinas en el suero de pacientes con ACLF comparado con aquel de pacientes con cirrosis descompensada (29); los pacientes con ACLF mostraron mayores niveles de 12 citocinas, la mayoría de las cuales se asocian con disfunción endotelial, así como con la quimiotaxis y migración de neutrófilos: VCAM-1, VEGF-A, fractalquina, MIP-1 $\alpha$ , eotaxina, IP-10, RANTES, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-2, ICAM-1, y MCP-1. Asimismo, se confirmó que la alteración inflamatoria en ACLF es independiente a la presencia de infecciones bacterianas, ya que dicho patrón de citocinas se mantuvo significativamente más alto en pacientes con ACLF en comparación con pacientes con infección bacteriana sin ACLF, con excepción de VEGF-A (29).

En otro estudio, Clària y colaboradores demostraron nuevamente una elevación significativa de citocinas en ACLF que corresponden de manera interesante tanto a una respuesta del sistema inmune innato, incluyendo TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10, MIP-1 $\beta$ , G-CSF y GM-CSF, como a una respuesta antiinflamatoria por la expresión elevada de IL-10 e IL-1Ra (30). Lo anterior muestra similitudes entre pacientes con ACLF y pacientes con sepsis severa, en los que parecen participar varios fenómenos inmunológicos complejos que culminan en daño sistémico. Dentro de estos, se han propuesto una tormenta de citocinas; la disonancia inmunológica, que consiste en la presencia simultánea y no balanceada de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) exacerbada y un síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria (CARS, por sus siglas en inglés); la hematopoyesis de emergencia, la cual explica la leucocitosis y su asociación con la gravedad y mortalidad en ACLF; así como una

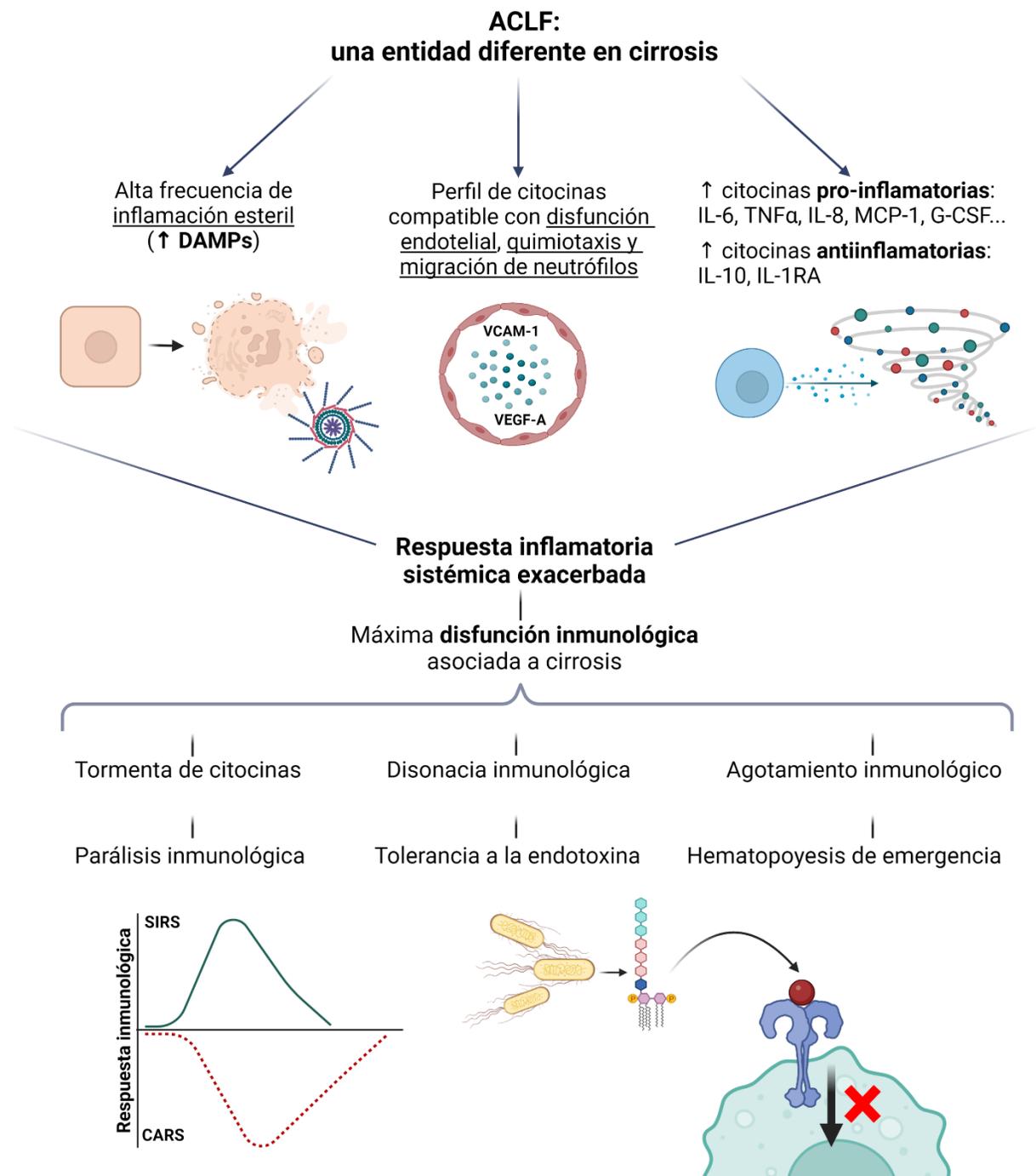
desregulación de los mecanismos de tolerancia inmunitaria y una sensibilidad alterada a patógenos bacterianos y al lipopolisacárido (LPS) (28, 31).

De manera relevante, un componente fundamental del sistema inmune innato que es central en la activación de respuestas proinflamatorias es el inflamasoma, de los cuales el más caracterizado es el inflamasoma NLRP3 (*nucleotide-binding domain, leucine-rich repeats-containing family, pyrin domain-containing-3*). Este consiste en un complejo de varias proteínas que se acoplan al ser detectados PAMPs y DAMPs citosólicos, resultando en la activación de caspasa-1 que a su vez genera las formas activas de las citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18, las cuales son liberadas y efectúan funciones inflamatorias. Asimismo, la activación del NLRP3 puede inducir un tipo de muerte celular llamado piroptosis en macrófagos y células dendríticas que ocasiona la liberación de aún más mediadores inflamatorios, pudiendo así contribuir también al fenómeno denominado tormenta de citocinas (32). En este sentido, se conoce por ejemplo que niveles altos de IL-1 $\beta$  son un predictor independiente del desarrollo de ACLF con consecuencias fatales en pacientes con cirrosis descompensada (33).

Considerado la posible participación del inflamasoma NLRP3 en la patogénesis de la ACLF, un estudio reciente demostró una alta expresión de NLRP3, caspasa-1 y de IL-1 $\beta$  e IL-18 en el tejido hepático de pacientes con ACLF, confirmando un elevado grado de inflamación intrahepática. Sin embargo, se observó también en ACLF una menor expresión del inflamasoma en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en comparación con pacientes con cirrosis sin ACLF y controles sanos (34). Una explicación a esta segunda observación es el fenómeno de tolerancia a la endotoxina, ya que se mostró que los monocitos CD14<sup>+</sup> sensibilizados previamente a LPS sufren una reprogramación fenotípica después de ser expuestos a una cantidad mayor de endotoxina que reduce su expresión de mediadores proinflamatorios, incluyendo la de NLRP3. Debido a un estado similar al del agotamiento inmunológico y debido a la respuesta inflamatoria debilitada, se considera por tanto una parálisis inmunitaria la cual se caracteriza por un cierto grado de inmunosupresión (34). Es decir, con la progresión de la enfermedad se da una transición del fenotipo predominantemente proinflamatorio (SIRS) a uno de inmunodeficiencia que predispone a mayor descompensación, riesgo de infecciones bacterianas, alteraciones hemodinámicas y eventualmente a fallas orgánicas extrahepáticas. Este fenómeno ha sido conocido como disfunción inmunológica asociada a cirrosis y representa el paradigma central de la progresión del curso clínico (35).

Es así como una de las tres características que distinguen a la ACLF del resto del espectro de enfermedad hepática crónica y cirrosis es el compromiso multiorgánico y no solo del hígado como principal componente afectado (26). Aunque en gran parte los cambios macrocirculatorios propios de la cirrosis hepática contribuyen a la disfunción de otros órganos, las alteraciones inflamatorias descritas en ACLF parecen ocasionar cambios microcirculatorios aún por estudiarse que aumentan dicho riesgo. Dentro de estos cambios, se encuentra la activación de las células de Kupffer, la cual propicia una consecuente activación y contracción de las células estrelladas; la activación de las células endoteliales sinusoidales con producción y liberación de mediadores vasoactivos (NO, ET-1), proinflamatorios y proadhesivos; alteraciones en la coagulación y sus mediadores; así como disfunción mitocondrial mediada por

procesos infecciosos. Todos estos procesos resultan en hipoxemia tisular y edema celular que en fases avanzadas conducen inevitablemente a la falla del o los órganos afectados (6, 36).



**Figura 4. Características fisiopatológicas de la ACLF.** La insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF) es evidentemente una entidad diferente dentro del espectro de cirrosis, cuya fisiopatología comparte características con la sepsis. Si bien toda fase de cirrosis presenta cierto grado de disfunción inmunológica, esta tiene su máxima presentación en ACLF. A esto

se le atribuye que el paciente con ACLF acabe presentando un estado predominantemente de inmunosupresión que lo predispone a un mayor riesgo de infecciones y a una alta mortalidad.

DAMP= patrón molecular asociado a daño; SIRS= síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; CARS= síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria.

Creado con BioRender.com

#### **1.4.4 Curso y manejo clínico de la ACLF**

A pesar de la progresión acelerada que sufren los pacientes que avanzan a un estado de ACLF y la alta mortalidad, aún no se cuenta con medidas satisfactorias de diagnóstico y terapéuticas que logren mejorar la supervivencia. Al momento, no existe tampoco una guía de práctica clínica, sin embargo, un estándar válido son las pautas desarrolladas por los investigadores del estudio CANONIC. Estos señalan, por un lado, calcular el score de falla orgánica CLIF-C OF mencionado previamente, con el que se confirma el diagnóstico de ACLF y se hace la clasificación en los grados 1, 2 o 3. Posteriormente, se debe calcular también el score CLIF-C ACLF que integra adicionalmente la edad del paciente y su cuenta de leucocitos. Este da un puntaje entre 0 y 100 con el que se interpreta la mortalidad al mes, 6 meses y al año, siendo el puntaje más alto el que se asocia con mayor mortalidad. Al juntar cuatro factores independientes asociados con mortalidad en pacientes con ACLF, el score CLIF-C ACLF ha mostrado una mayor precisión que incluso los scores convencionales en cirrosis (MELD, MELD-Na y Child-Pugh), por lo que es de gran utilidad si se actualiza diariamente para valorar la mejoría o empeoramiento del paciente durante su estancia hospitalaria (28, 37). De hecho, la recomendación es valorar el puntaje CLIF-C ACLF del paciente después de 3 a 7 días de la intervención inicial en la unidad de cuidados intensivos ya que, de ser alto, en específico mayor a 64, se puede considerar fútil un trasplante hepático debido a la mortalidad igual o cercana al 100% (38).

La evidencia que sustenta estas prácticas en el manejo de la ACLF surge a partir del primer estudio en evaluar y caracterizar su curso clínico, y que de manera interesante descubre que el diagnóstico de ACLF es altamente dinámico y reversible (38). De acuerdo con aquellos análisis, en un periodo de observación de 28 días se encontró que el 55% de los pacientes diagnosticados con ACLF grado 1 logran mejorar a los 3 a 7 días desde la presentación del síndrome y revierten a un estado sin ACLF, mientras que el 24% permanece sin cambio y 21% empeora a ACLF grado 2 o 3. Dependiendo de dicho cambio, la mortalidad puede disminuir hasta 7% cuando mejora el paciente o aumentar hasta 88% si empeora a ACLF grado 3. En el caso de pacientes con ACLF grado 2, sólo un 35% logró revertir a un estado sin ACLF, 25% permaneció sin cambio, y 25% empeoró a ACLF grado 3. Por otro lado, una menor cantidad de aquellos que inicialmente presentaron ACLF grado 3 (16%) revirtió de ACLF y la mayoría, 68%, permaneció en este grado de enfermedad (38). Los autores de este estudio concluyeron que en general los pacientes con ACLF presentan mejoría en su curso clínico, aunque debido a la alta mortalidad que adquiere el paciente si empeora a los grados 2 y 3, se considera crítica la intervención temprana para disminuir el riesgo, así como la valoración del paciente para ser enlistado como posible receptor de trasplante hepático, que al momento es el único tratamiento

definitivo. De estos datos se desprende también que el mejor punto en el tiempo para definir el curso del paciente es al tercero o máximo séptimo día después del diagnóstico, ya que el 81% no presentó fluctuaciones adicionales a partir de este corto periodo de tiempo. Otro punto relevante que ha sido confirmado subsecuentemente en otros estudios es el hecho que la supervivencia al año del paciente con ACLF que recibe trasplante continúa siendo alta con una mínima de 71.6% y una máxima de 80%, a pesar de disminuir ligeramente en caso de presentar este síndrome al momento del trasplante (38).

Actualmente, el problema más importante en cuanto a la posibilidad de que un paciente con ACLF reciba un trasplante hepático es la desventaja que presenta al ser ingresado a la lista de espera. Esto se puede observar en la cohorte del estudio CANONIC en la que aproximadamente sólo un 9% recibió trasplante dentro de los primeros 28 días después de su admisión hospitalaria, un 14% dentro de los 90 días, y un 20% al año de ser incluidos en el estudio (37, 38). El hecho que la mayoría de los pacientes con ACLF presentan infección activa, edema cerebral o inestabilidad hemodinámica los hace tener una contraindicación relativa o total al trasplante hepático, por lo que muchos son categorizados como *too sick to transplant* (demasiado enfermos para trasplantar). No obstante, la necesidad y beneficio del trasplante hepático en todo aquel diagnosticado con ACLF es evidente. En los pacientes del estudio CANONIC se vio que la mortalidad de quienes no recibieron esta terapia fue más de 80%, comparada con una mortalidad de 20% en aquellos que sí la recibieron (27). Por otro lado, un estudio reportó que la supervivencia al año y a los 5 años de los pacientes con ACLF que fueron trasplantados fue de 87% y 82%, lo que es comparable con la supervivencia esperada de cualquier otro paciente sin ACLF (39). Incluso, otro estudio reportó que aquellos pacientes con ACLF grado 3, y por tanto aquellos con el mayor número de fallas orgánicas, presentaron una supervivencia al año posterior al trasplante hepático de 83.9% en comparación con la de 7.9% de aquellos que no recibieron trasplante, demostrando que existe un gran beneficio aún en los pacientes con la más alta gravedad de la enfermedad. Sin embargo, la desventaja en estos últimos pacientes es que, a pesar de la disminuida mortalidad, el 100% desarrolló complicaciones posteriores al trasplante, principalmente infecciones, y una prolongada estancia hospitalaria (40).

Dada las posibilidades limitadas del trasplante hepático, incluyendo la disponibilidad limitada de donadores, se han propuesto tratamientos alternativos que principalmente sirven de puente en lo que el paciente con ACLF puede ser intervenido. Una de ellos es el uso de máquinas extracorpóreas de soporte hepático, las más conocidas siendo los sistemas MARS o Prometheus, cuyo propósito es el de reducir los niveles plasmáticos de sustancias con efectos deletéreos como PAMPs, DAMPs, prostaglandinas y óxido nítrico, además de ofrecer soporte hepático por medio de membranas de hepatocitos activos que también filtran el plasma y potencialmente ayudan en las funciones de detoxificación, metabolismo y síntesis; no obstante, los estudios al momento no han mostrado un beneficio mayor ni una mejoría de la supervivencia (9, 41). Otra alternativa evaluada, es la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos bajo la hipótesis que promueve la regeneración hepática por medio de la movilización de células hematopoyéticas progenitoras CD34<sup>+</sup> además de restaurar la función alterada de los neutrófilos, lo que mostró un aumento de la supervivencia de 40% a los 60 días,

una reducción del score Child-Pugh de 33.3% y del MELD de 15.3%, con disminución también en la incidencia de sepsis, síndrome hepatorenal y encefalopatía hepática (42). Con esta evidencia, se sustenta la necesidad no solo de mejores alternativas terapéuticas, sino también de métodos de diagnóstico temprano de la ACLF. En definitiva, se requiere una mejor comprensión de su fisiopatología, para lo cual serán necesarios estudios adicionales con cohortes diferentes para analizar con mayor detalle el curso clínico e identificar potenciales áreas de intervención temprana, y así agilizar y hacer posible el que estos pacientes reciban un trasplante hepático. Considerando la relevancia del síndrome de disfunción inmunológica, es posible que mediadores inflamatorios clave sean marcadores importantes de descompensación y sirvan para pronosticar el desenlace del paciente si recibe o no un trasplante. Incluso podrían tener aplicación como blancos terapéuticos de confirmarse una asociación relevante con el estado de enfermedad.

## 1.5 GALECTINA-3

### 1.5.1 La galectina-3 como molécula única entre las lectinas

Las lectinas constituyen un grupo amplio y ubicuo de proteínas presentes no solo en animales, sino también en plantas, hongos, bacterias y virus. Se pueden definir como proteínas capaces de reconocer específicamente y unirse de manera reversible a regiones particulares de carbohidratos dentro de carbohidratos complejos (43). Sus funciones son variadas, aunque participan principalmente activando cascadas de señalización, y también se les conoce como proteínas chaperonas o de tipo andamio. Dentro de las lectinas se encuentran las pentraxinas como es la proteína C reactiva y el componente amiloide P sérico; las colectinas como la lectina de unión a la manosa; la ligasa de ubiquitina E3; las calnexinas y calreticulinas; componentes de la cápside de ciertos virus como el adenovirus, rotavirus y poliomavirus; y varias toxinas bacterianas como la botulínica y la enterotoxina estafilocócica (43, 44).

Una de las familias de las lectinas corresponde a la de las galectinas, de las cuales se han caracterizado 15 en mamíferos. La característica que define a una galectina es una región C terminal de 130 aminoácidos que cuenta con la capacidad de reconocer carbohidratos (CRD, por sus siglas en inglés *carbohydrate-recognition domain*) y es especialmente afín a la galactosa. De acuerdo con el número de estas regiones, las galectinas son categorizadas en 3 familias: las prototipo que se componen de una sola CRD; las de tipo tándem que contienen dos CRD unidas por una cadena de 70 aminoácidos; y las de tipo quimera, cuyo único miembro es la galectina-3 ya que su estructura incluye también una región N terminal. Esta propiedad le permite a la galectina-3 formar dímeros e incluso pentámeros de manera que varios de sus ligandos pueden ser entrecruzados al mismo tiempo, lo que inicia eventos de señalización transmembrana con implicaciones en varias funciones celulares. (45)

### 1.5.2 Descubrimiento de Mac-2 (galectina-3) como molécula fisiopatológicamente relevante

La caracterización y el estudio de este grupo en específico de lectinas ha sido resultado de la unificación de varias observaciones aisladas. El primer reporte que se tiene sobre la galectina-3 en la literatura es el artículo de Ho y Springer publicado en 1982, en el que detallaron la identificación de un antígeno adicional al macrophage (Mac)-1 (ahora conocido también como el receptor del complemento 3, CR3) mediante la creación de anticuerpos monoclonales por técnica de hibridoma (46). Este nuevo antígeno, al que acuñaron Mac-2, se encontró expresado específicamente en macrófagos de exudado peritoneal inducidos por ácido tioglicólico, un inductor potente de inflamación que recluta cantidades abundantes de macrófagos peritoneales. Lo anterior parecía indicar la existencia de una molécula distintiva de macrófagos proinflamatorios, puesto que la expresión de Mac-2 mediante citometría de flujo e inmunoprecipitación se encontró negativa en linfocitos y células polimorfonucleares, e incluso en los macrófagos peritoneales residentes y en aquellos estimulados por LPS o directamente por patógenos como *Listeria monocytogenes*. Es decir, Mac-2 mostró positividad únicamente ante una reacción inflamatoria intensa, que en este caso fue inducida por el tioglicolato en la cavidad peritoneal de ratones.

Tiempo después, en 1989, el equipo de Cherayil y colaboradores al buscar profundizar en la estructura y función de Mac-2, sintetizaron su cDNA encontrado que la secuencia de nucleótidos era idéntica a la de una lectina descrita previamente llamada CBP35 (por sus siglas en inglés *carbohydrate binding protein*, proteína que se une a carbohidratos), que se conocía por su especificidad para galactosa y su afinidad para unirse a IgE (47). Aún más importante, se descubrió que en macrófagos inflamatorios peritoneales (por análisis de pulso y caza y fraccionamiento subcelular) Mac-2 se ubica no solo en el citosol, sino también en la membrana celular y en el espacio extracelular. Con esta información los autores concluyeron que Mac-2 tiene la posibilidad de ser secretada por mecanismos desconocidos, ya que su cDNA no codifica para un péptido señal o dominio transmembrana (48).

De manera similar, en 1990 el equipo de Woo y colaboradores demostró que Mac-2 es la misma proteína que una caracterizada previamente en macrófagos de unión a la laminina, al compartir un peso molecular idéntico de 32,000 a 35,000 daltones (49). Con este hallazgo se describe por primera vez una función no relacionada con la inflamación, descubriendo que ejerce también un papel importante en la adhesión celular mediante la interacción y unión con la laminina presente en la membrana basal. En específico, Mac-2 resultó ser una proteína que participa en la migración de los macrófagos por diapédesis ante respuestas inflamatorias. Debido a la importancia clínica que fue adquiriendo Mac-2, el equipo de Cherayil fue el primero en 1990 en describir su homólogo en macrófagos humanos (50). A partir de entonces, gran parte de los estudios relacionados con Mac-2 en la patología humana se enfocaron en analizar su papel en los procesos neoplásicos, dado un hallazgo preliminar sobre su función como facilitador de la adhesión celular y al encontrarse homología entre la secuencia de Mac-2 y la de L-34, una lectina caracterizada previamente en la superficie celular de tumores (51). De manera importante, las nuevas publicaciones a partir de 1994 empezaron a referirse a Mac-2 bajo el nombre de *galectina-3* que es actualmente vigente. Esto fue resultado de la propuesta de Barondes y colaboradores quienes buscaron establecer una nomenclatura que unificara a todas las lectinas de unión a  $\beta$ -galactósidos, ya que la falta de un término común impedía la comunicación clara y propiciaba la proliferación de otros nombres (52).

### **1.5.3 Localización y funciones de la galectina-3**

Se conoce ahora que la galectina-3 es de especial relevancia dada su amplia distribución en el cuerpo humano y las múltiples funciones que ejerce, incluyendo aquellas relacionadas con la apoptosis; con el reconocimiento de ligandos microbianos incluyendo el LPS; y con la activación de respuestas del sistema inmune innato. Esta galectina se puede encontrar en la mayoría de los tejidos, como es en corazón, riñón, pulmones, e hígado, y su mayor expresión es en las células mieloides (por ejemplo, neutrófilos y macrófagos) y en fibroblastos (53). De manera interesante, su ubicación celular es igualmente diversa ya que se puede encontrar intranuclear, en el citoplasma o en la membrana, y como mencionado anteriormente, incluso también en el espacio extracelular a pesar de que carece de un péptido señal; esta propiedad es compartida por todas las familias de galectinas, y en el caso de la galectina-3 se sabe que ocurre especialmente ante estímulos como el interferón (IFN)- $\gamma$  y el LPS (45, 53).

Considerando que la galectina-3 existe tanto de manera intracelular como extracelular, sus funciones en el organismo son variadas. Se concuerda que de encontrarse en el citoplasma ayuda en la supervivencia celular e influye sobre el ciclo celular y la diferenciación celular mediante la interacción con diversas proteínas, incluyendo aquellas antiapoptóticas y oncoproteínas como Bcl-2 y K-Ras (54, 55). A pesar de que la galectina-3 no posee una señal de localización intranuclear (56), se ha reportado su función en el *splicing* del pre-ARNm mediante su asociación con complejos de ribonucleoproteínas (57) e incluso también en la regulación transcripcional, por ejemplo, induciendo la activación del promotor de la ciclina D<sub>1</sub> (58). Extracelularmente ejerce diversos efectos autocrinos y paracrinos, lo que incluye: mediar la interacción celular con la matriz extracelular al poseer afinidad a la laminina, fibronectina, colágeno tipo IV, elastina entre otras proteínas (59); modular la adhesión celular y por tanto también la migración celular por su afinidad a la integrina  $\alpha 1\beta 1$  (CD11b) y a CD98 presentes en la superficie de monocitos y macrófagos (60); e intervenir en la activación de diferentes células efectoras, especialmente del sistema inmune innato, al propiciar cascadas de señalización por el entrecruzamiento de sus receptores y potenciando, por ejemplo, la producción de IL-1 en monocitos o la producción de superóxido en neutrófilos (61-64).

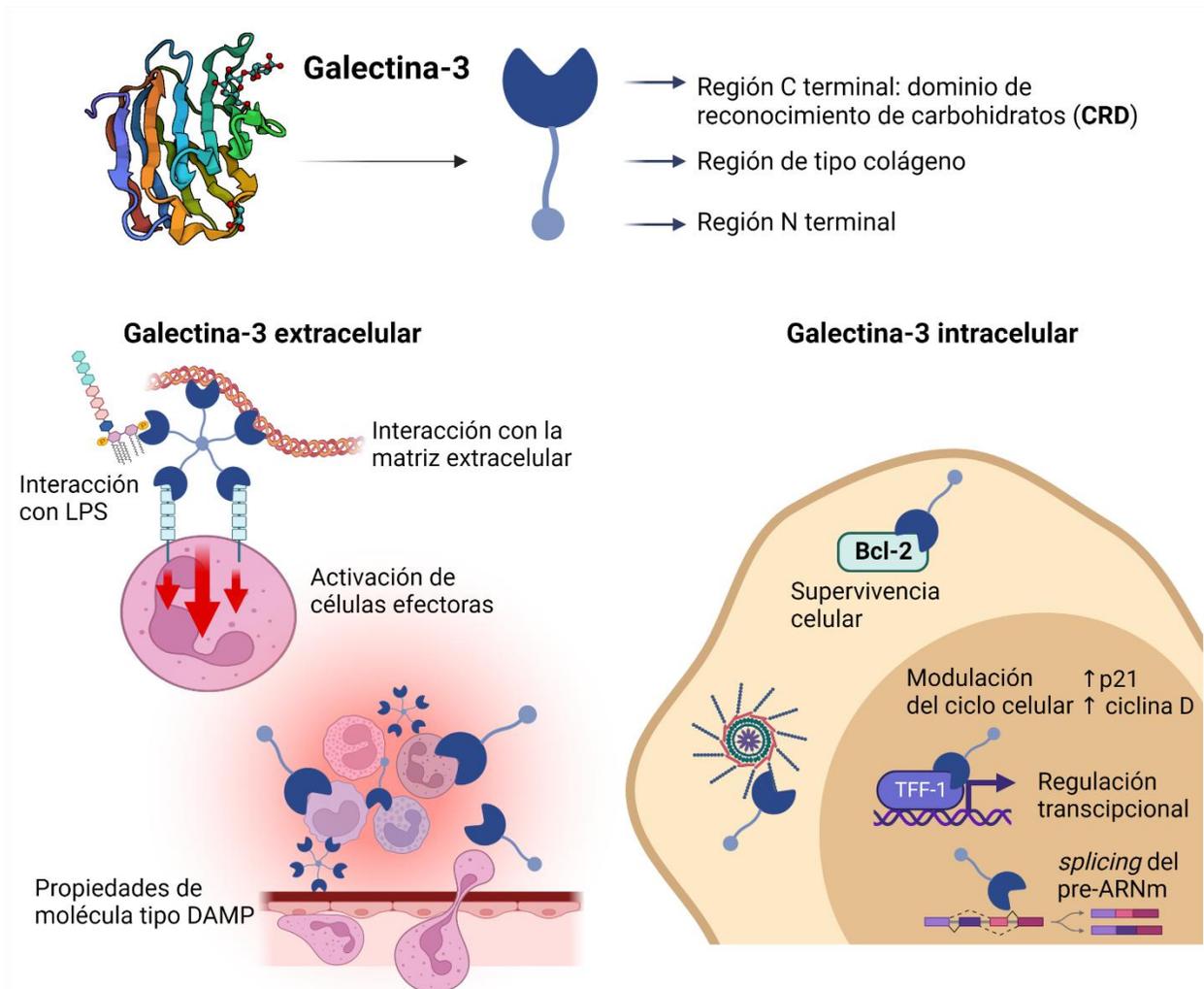
#### **1.5.4 La galectina-3 como mediador inflamatorio**

De esta manera, es evidente que la participación más importante de la galectina-3 en el organismo es en la inflamación, incluso se le empieza a conocer más como un tipo de mediador inflamatorio. Como ya mencionado, esta molécula es particularmente interesante dado que carece de péptido señal, de manera que las explicaciones sobre su secreción extracelular han permanecido imprecisas. Se ha sugerido que su secreción es mediante vesículas extracelulares y que se encuentra de forma libre (65, 66). No obstante, recientemente se ha demostrado que su ruta principal de secreción es con la activación del inflammasoma ya que, tras la escisión y activación de la gasdermina-D, el proceso de piroptosis culmina con la liberación no solo de mediadores como IL-1 $\beta$  e IL-18 sino también de galectina-3. Incluso, la evidencia muestra que, debido a su bajo peso molecular, la galectina-3 no requiere de lisis celular para ser secretada, sino tan solo de la presencia de poros en la membrana celular lo que implica la posibilidad de una liberación masiva después de daño celular mínimo. (67)

De manera interesante, la galectina-3 tiene una relación estrecha con el antígeno bacteriano LPS. Se ha demostrado que esta se puede unir al LPS de diversas bacterias, incluyendo aquel de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, tanto por su CRD como por su región N terminal. Debido a su interacción también con las células efectoras del sistema inmune innato y la matriz extracelular, la galectina-3 parece ayudar en la presentación de este antígeno y favorecer la adhesión de patógenos a la matriz extracelular, propiciando así la respuesta inflamatoria (53, 68). Cabe considerar, sin embargo, que debido a la alta afinidad de esta glicoproteína a toda la estructura del LPS, las cascadas de señalización del LPS se pueden ver en parte suprimidas a causa de una interferencia con su receptor (69).

Esta interacción entre galectina-3 y el LPS ha sido descrita también en el contexto de una reacción hiperinflamatoria con lesión pulmonar extensa inducida en ratones por *Francisella*

*novicida*, donde esta glicoproteína se asoció con una elevación significativa de marcadores de sepsis (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$ ), además de marcadores de lesión vascular incluyendo fibrinógeno, proteína C reactiva y trombopoyetina. Esta reacción inflamatoria se vio intensificada por una mayor activación de los neutrófilos, de manera que la presencia de esta glicoproteína contribuyó a una menor supervivencia. Asimismo, galectina-3 se encontró localizada en el tejido pulmonar en áreas de apoptosis e infiltración celular extensa, por lo que se sugirió por primera vez la posibilidad de que esta glicoproteína participa específicamente como un DAMP (70). Corroborando este hallazgo, otro artículo demostró que la inoculación directa de galectina-3 en ratones infectados con *Leishmania major* ocasionó una migración rápida de neutrófilos al sitio inoculado, a pesar de ser una molécula que no cumple con las características de una quimiocina (71). De ser una alarmina, la galectina-3 podría ser una molécula que amplifica y exagera también la inflamación estéril dada su importante relación con el inflamasoma.



**Figura 5. Galectina-3.** Como parte de las lectinas de unión a  $\beta$ -galactósidos, la galectina-3 es única en su familia al contar tanto con una región C terminal que reconoce y se une a carbohidratos, como también una región N terminal que es a la que más se le atribuye la propiedad de esta glicoproteína de oligomerizarse, formando incluso pentámeros. Su presencia

es ubicua y puede encontrarse tanto extracelularmente como intracelularmente, ejerciendo así diversas funciones. Al oligomerizarse podría potenciar la activación de células efectoras y realizar funciones adicionales como el anclaje a la matriz extracelular o incluso la presentación de ciertos antígenos como el LPS.

DAMP= patrón molecular asociado a daño

Creado con BioRender.com

### **1.5.5 La galectina-3 en la enfermedad hepática**

En la patología humana, el papel de la galectina-3 se empieza a entender, siendo de gran relevancia clínica hasta el momento los estudios de esta glicoproteína relacionados con la enfermedad cardíaca. El estudio índice en este tema fue publicado en el 2004 por el equipo de Schroen y colaboradores quienes evaluaron la expresión de genes en el miocardio de ratas antes del desarrollo de insuficiencia cardíaca; de acuerdo con los resultados de un microarreglo, se demostró que el gen de la galectina-3 es el que se expresa de manera más robusta y significativa en el corazón con insuficiencia en comparación con aquel con función preservada (72). Un estudio adicional mostró el papel patológico de esta lectina al ser inoculada directamente en el saco pericárdico de ratas sanas, ocasionando fibrosis cardíaca por proliferación fibroblástica y depósito de colágeno (73). El interés por la utilidad de la galectina-3 como biomarcador de insuficiencia cardíaca en humanos conllevó a su aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en Estados Unidos en el 2010 (74). A la par, estudios adicionales se han desarrollado para evaluar su asociación con otros órganos y enfermedades que tienen tanto un componente de inflamación como de fibrosis. El riñón ha sido uno de los órganos ampliamente estudiados, y se conoce la utilidad de la galectina-3 como biomarcador de lesión renal crónica al correlacionarse con la disminución de la tasa de filtración glomerular (75).

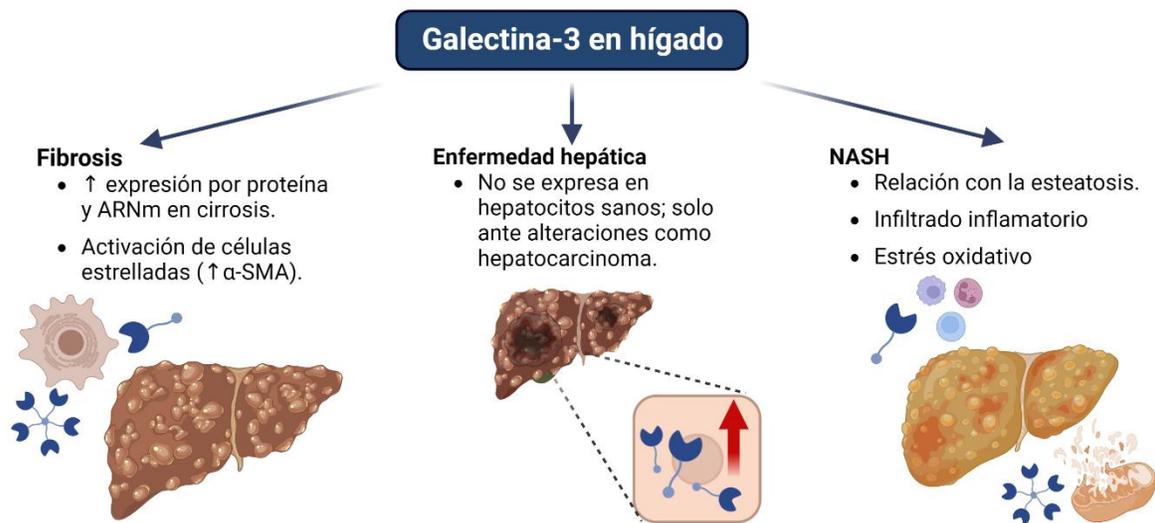
En hígado, falta aún por comprender y determinar la presencia y función de la galectina-3. En el estudio de Henderson *et al.*, esta glicoproteína fue analizada tanto en ratones a los que se les indujo fibrosis hepática con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), como también en muestras humanas de cirrosis secundaria a hepatitis B y C, hepatitis autoinmune, hepatitis alcohólica, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, y cirrosis biliar primaria, observando una marcada expresión tanto a nivel de proteína como de ARNm en comparación con hígados sanos y sin fibrosis (76). Por análisis de inmunohistoquímica se observa que la galectina-3 en el hígado humano normal se encuentra ausente en los hepatocitos y se expresa únicamente en el epitelio de los conductos biliares (colangiocitos), en las células de Kupffer y en células dendríticas. Un hallazgo sorprendente es que en condiciones patológicas de cirrosis e incluso de hepatocarcinoma, esta expresión se puede localizar ahora en los hepatocitos, especialmente en los nódulos de regeneración, así como en las áreas periportales y puentes de fibrosis, encontrando mayor intensidad en la periferia de estas zonas y un patrón que sigue aquel donde hay depósito de matriz extracelular (77). Esta positividad en el tejido hepático humano se ha encontrado aumentada hasta en un 76% en condiciones patológicas y se sugiere que también se puede ver relacionada con un índice mitótico elevado. (76, 78, 79)

De manera interesante, la expresión del ARNm de la procolágena tipo I es significativamente menor en los hígados con fibrosis de los ratones *knockout* de galectina-3 comparada con la de los ratones *wild type*, lo que sugiere una asociación entre los niveles de la galectina-3 y el grado de fibrosis hepática. Adicionalmente, se mostró que la galectina-3 está implicada en la activación de las células estrelladas y por tanto en su diferenciación en miofibroblastos, los cuales depositan matriz extracelular en el hígado. Incluso, se encontró una correlación significativa con TGF- $\beta$ , la principal citocina profibrogénica (76). Confirmando la participación clave de la galectina-3 en la fisiopatología de la fibrosis hepática, la inhibición de esta lectina en ratones mediante la inoculación de polisacáridos como el galactomanano, ha mostrado revertir el estado de cirrosis con reducción del depósito de colágeno e inflamación portal (80, 81).

La participación de la galectina-3 en la enfermedad hepática ha sido descrita en particular con relación a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Su depleción en esta etiología mostró efectos benéficos al presentarse una atenuación de la síntesis y oxidación hepática de los ácidos grasos, además de una menor infiltración inflamatoria y esteatosis histológica. Asimismo, una mejoría de dicho estado patológico se pudo interpretar debido a una disminución del estrés oxidativo, con menor acumulación de productos finales de lipooxidación avanzada y una menor expresión de sus receptores (82). Hallazgos similares se pudieron repetir en otro modelo de NASH después de inhibir la galectina-3 mediante un tratamiento con polisacáridos. No obstante, los beneficios de esta terapia no se limitaron al hígado ya que incluso hubo mejoría de la función renal, lo que se debió a un restablecimiento de la glomerulopatía y fibrosis intersticial (83). A pesar de dichos hallazgos, en un ensayo clínico reciente fase 2b con pacientes con cirrosis por NASH e hipertensión portal el tratamiento con belaepectina (uno de los polisacáridos que inhibe a galectina-3) no resultó en cambios significativos con respecto a una disminución de la presión venosa portal o de la fibrosis y tampoco una menor incidencia de complicaciones relacionadas con la cirrosis. Los autores señalaron que habría que descartar fallas inherentes al estudio como la inclusión de pacientes con cirrosis e hipertensión portal avanzada además de la dosis y duración de la terapia, ya que en un subgrupo de pacientes sin várices esofágicas sí se logró una reducción significativa de la presión portal tras la inhibición de galectina-3 (84).

De esta manera, la evidencia al momento en torno a la galectina-3 señala implicaciones claras en los mecanismos de enfermedad hepática. En efecto, niveles elevados de galectina-3 han sido reportados en cirrosis alcohólica y no alcohólica en comparación con sujetos sanos, e incluso se ha observado tanto una correlación con la gravedad de la enfermedad, de acuerdo con las escalas de Child-Pugh y MELD, como también poder diagnóstico para discriminar entre estas etiologías (79, 85). Dicho fenómeno parece explicarse debido a que existe una activación en la síntesis de galectina-3 tanto en hepatocitos como en colangiocitos en el hígado cirrótico, además de una disminución en la depuración hepática de esta glicoproteína debido a niveles significativamente más altos en la vena hepática que en la vena porta. Corroborando la asociación entre galectina-3 y el grado de cirrosis, aquellos con el score de Child-Pugh más alto mostraron tener valores más elevados de galectina-3 y de manera interesante, se ha encontrado también una correlación con la disfunción hepática y renal (79). Este papel de la

galectina-3 en el hígado es aún más complejo debido a su potencial función como alarmina y mediador del inflamasoma, e incluso como promotor de la regeneración hepática (86). No obstante, estos mismos aspectos apuntan ser relevantes en la comprensión fisiopatológica de las fases avanzadas de cirrosis incluyendo el síndrome de ACLF, lo que sugiere la necesidad de estudiar a galectina-3 como un potencial biomarcador y blanco terapéutico.



**Figura 6. La galectina-3 en la enfermedad hepática.** La relevancia fisiopatológica de la galectina-3 en el hígado empieza a ser comprendida. Es evidente su participación en procesos patológicos de manera que es necesario esclarecer aún más su papel en la cirrosis y su utilidad clínica.

NASH= esteatohepatitis no alcohólica

Creado con BioRender.com

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

A pesar de que en los últimos años la insuficiencia hepática aguda sobre crónica se ha establecido como una entidad patológica distinta dentro del espectro de cirrosis, aún falta por discernir varios aspectos relacionados con su historia clínica y fisiopatología. Actualmente se cuenta con escasas teorías que explican posibles causas de la descompensación aguda acompañada de falla multiorgánica que distingue a este diagnóstico y falta por caracterizar mejor su curso de enfermedad, el cual es altamente dinámico y de elevada mortalidad. Aunado a esta carencia de conocimiento médico, se requiere proponer moléculas con relevancia fisiopatológica y potencial uso como biomarcadores para de esta manera tomar una decisión oportuna en cuanto a medidas preventivas o la evaluación del paciente como potencial candidato a trasplante hepático ortotópico. La evidencia que ha sido publicada en torno a las diversas funciones de la galectina-3 tanto en el sistema inmunológico como en los procesos fibrogénicos parece ser compatible con el desarrollo de cirrosis, así como con los mecanismos inmunopatológicos descritos en la ACLF. La posibilidad de que la galectina-3 sea una molécula con alta expresión tanto sistémica como intrahepática en pacientes con cirrosis avanzada incluyendo ACLF aún no se ha explorado. Por tal motivo, el estudio de esta asociación podría esclarecer la utilidad clínica de dicha molécula y con esto mejorar el diagnóstico y tratamiento.

### 2.2 HIPÓTESIS

La descompensación por cirrosis se asocia a una mayor expresión de galectina-3, siendo aún más evidente en pacientes con insuficiencia hepática aguda sobre crónica al funcionar como un patrón molecular asociado a daño que es secretado debido a la elevada lesión hepática. La galectina-3 es responsable de desencadenar una respuesta inflamatoria exacerbada y a contribuir en mecanismos relacionados con la desregulación transcripcional hepática y la disfunción del ciclo celular que ocasionan la pérdida de función del hepatocito y la progresión de la enfermedad.

### 2.3 OBJETIVOS

Objetivo principal: Estudiar la expresión de galectina-3 a nivel sistémico y hepático y sus implicaciones sobre el sistema inmunológico y la funcionalidad del hepatocito para comprender posibles diferencias entre pacientes que desarrollan cirrosis descompensada incluyendo insuficiencia hepática aguda sobre crónica, asociando esta glicoproteína como potencial biomarcador y blanco terapéutico.

### Objetivos específicos:

- Demostrar la expresión de galectina-3 a nivel de proteína en la circulación e hígado y a nivel de ARNm en hígado en pacientes con diferentes estadios de cirrosis incluyendo insuficiencia hepática aguda sobre crónica, y su asociación con la descompensación de la enfermedad hepática y la gravedad del paciente.
- Analizar y comparar la expresión por ARNm de marcadores de la inmunidad innata en muestras de hígado humano de pacientes con diferentes estadios de cirrosis, correlacionando con la expresión de galectina-3 para determinar un posible mecanismo inflamatorio que se relaciona con la descompensación hepática.
- Analizar la expresión por ARNm de los factores principales que componen el sistema de transcripción hepático en las muestras de hígado de los pacientes con cirrosis, determinando una posible desregulación transcripcional hepática vinculada a galectina-3 como mecanismo de enfermedad en cirrosis avanzada.
- Analizar la expresión a nivel de ARNm y proteína de marcadores del ciclo celular en las muestras de hígado de los pacientes con cirrosis y su asociación con los niveles de expresión de galectina-3 como mecanismo de enfermedad en cirrosis avanzada.

## **2.4 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Cohorte ambispectiva de pacientes que recibieron trasplante hepático ortotópico en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

## **2.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN**

### **2.5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

#### Muestras experimentales:

- Provenientes de pacientes adultos con diagnóstico de cirrosis sin importar el estadio de enfermedad o etiología, de ambos géneros y que recibieron trasplante hepático ortotópico en el INCMNSZ entre el 1ro de enero de 2015 y el 31 de diciembre de 2019.

#### Muestras control:

- Injerto hepático de donadores cadavéricos de ambos géneros, que por estudio anatomopatológico se confirma libre de enfermedad.
- En el caso de los análisis con suero se consideran sujetos sanos de ambos géneros, dentro de la edad mediana de los pacientes con cirrosis, sin comorbilidades.

### **2.5.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

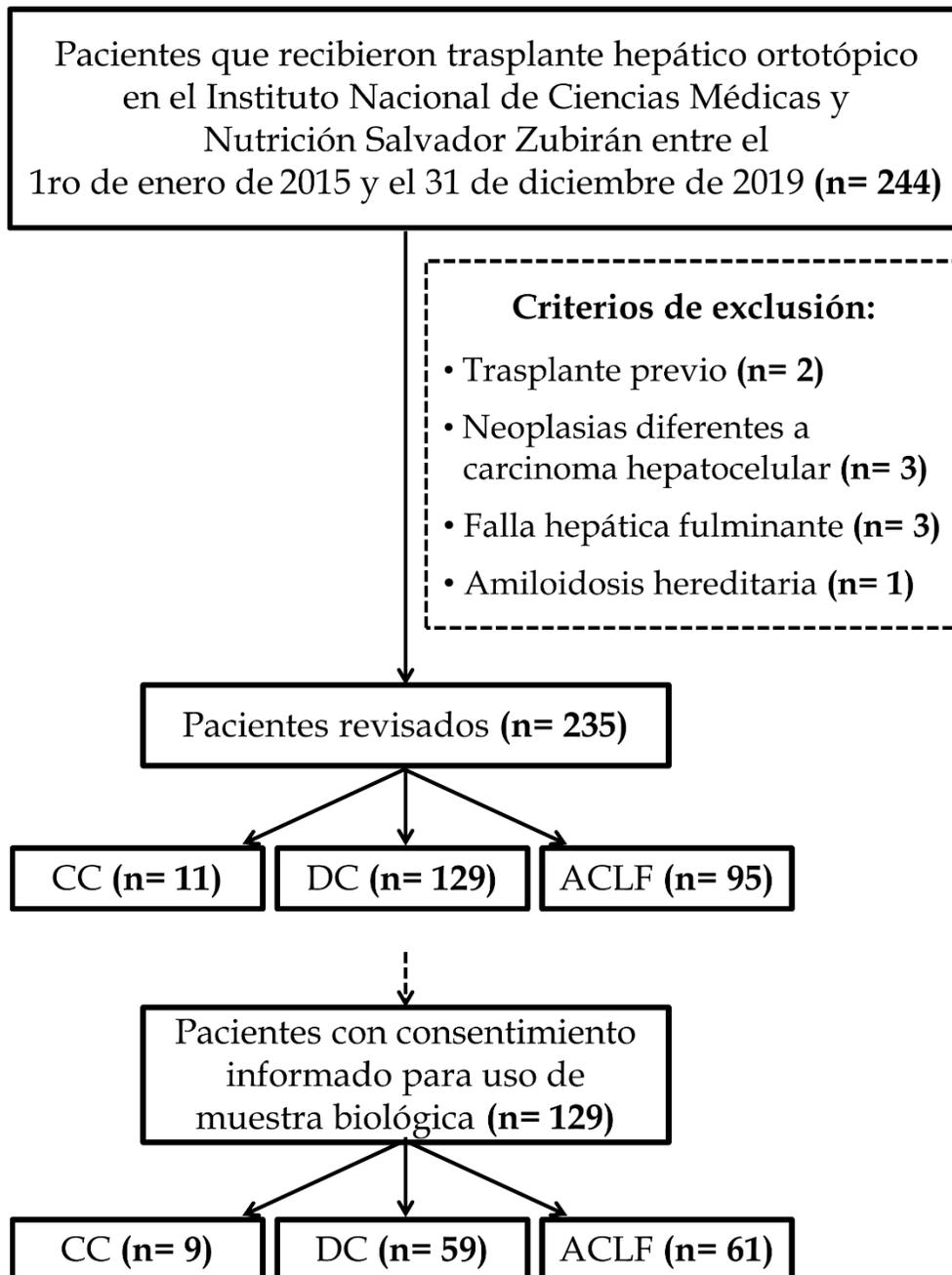
- Pacientes con antecedente de un trasplante hepático previo.
- Pacientes con neoplasias diferentes a carcinoma hepatocelular o con antecedente de metástasis hepáticas.
- Pacientes que recibieron trasplante debido a falla hepática aguda fulminante.

- Pacientes que recibieron trasplante debido a amiloidosis hereditaria.

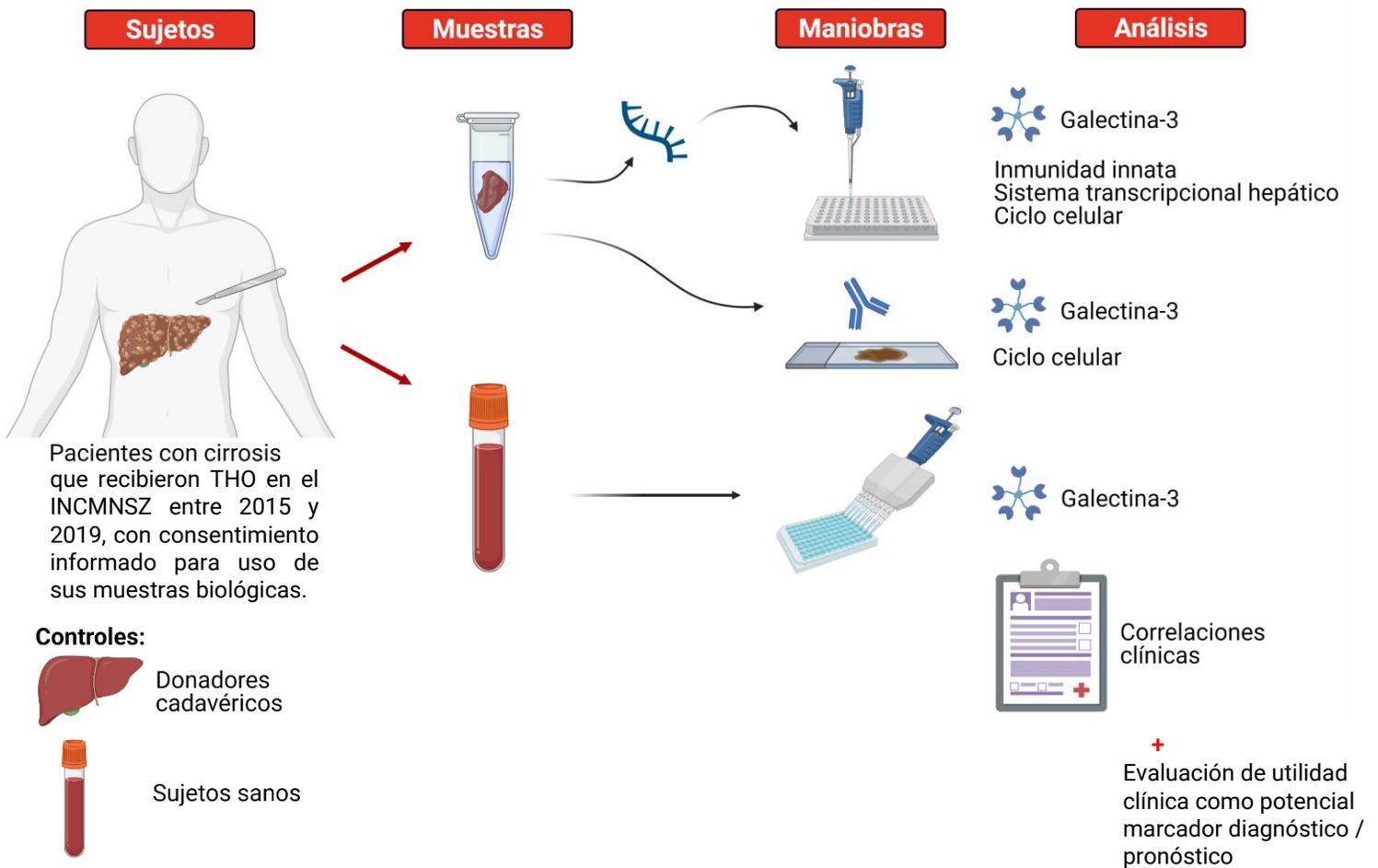
### 2.5.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes cuyas muestras no se lograron conservar en condiciones adecuadas para los análisis planeados.

### FLUJOGRAMA DE LOS PACIENTES ANALIZADOS



## DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO



Creado con BioRender.com

## 2.6 VARIABLES Y DESENLACES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medición	Escala de medición
<b>Variable dependiente</b>				
<b>Gravedad de la enfermedad</b>	Estado de progresión de la enfermedad hepática.	<p><b>Cirrosis compensada:</b> sin síntomas relacionados con la hipertensión portal causada por la fibrosis hepática.</p> <p><b>Cirrosis avanzada:</b> presencia de cirrosis descompensada o ACLF.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cirrosis descompensada:</b> manifestación de síntomas relacionados con la hipertensión portal causada por la fibrosis hepática, incluyendo ascitis, encefalopatía o hemorragia gastrointestinal.</li> <li>• <b>ACLF:</b> presencia de falla hepática y/o fallas extrahepáticas (renal, cerebral, de la coagulación, circulatoria, o pulmonar) valoradas con el score CLIF-C OF (37), en el contexto de un evento agudo de ascitis de gran volumen, encefalopatía, hemorragia gastrointestinal o infección bacteriana.</li> </ul>	<p>1= Cirrosis compensada</p> <p>2= Cirrosis avanzada</p>	Cualitativa nominal dicotómica
<b>Variables independientes</b>				
<b>Galectina-3</b>	Lectina que se une a $\beta$ -galactósidos con presencia intra- y extracelular, implicada en diferentes procesos incluyendo aquellos de inflamación y fibrosis.	Proteína evaluada en el suero mediante ELISA y en el hígado mediante PCR cuantitativa e inmunohistoquímica.	<p>ng/mL</p> <p>Expresión relativa/18s</p> <p>% de área positiva a galectina-3</p>	Cuantitativa continua

<b>IL-6</b>	Citocina proinflamatoria característica que regula la respuesta aguda ante lesión tisular e infección.	Marcador evaluado en el hígado mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>IL-8</b>	Citocina involucrada en la respuesta proinflamatoria que funciona principalmente como quimioatrayente y activador de neutrófilos.	Marcador evaluado en el hígado mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>MCP-1</b>	Quimiocina característica de monocitos que influye en su infiltración a tejidos.	Marcador evaluado en el hígado mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>M-CSF</b>	Factor de crecimiento involucrado en el mantenimiento de múltiples poblaciones del linaje mieloide, pero en especial estimula la expansión de monocitos y macrófagos.	Marcador evaluado en el hígado mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>CD66b</b>	Marcador de neutrófilos activados implicado también como potencial receptor de galectina-3.	Marcador evaluado en el hígado mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>MPO</b>	La mieloperoxidasa es una enzima que caracteriza a los neutrófilos y tiene función en la respuesta de defensa frente a infecciones.	Marcador evaluado en el hígado mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>HNF4a</b>	Factor de transcripción enriquecido en el hígado que regula varios genes necesarios para mantener la función hepática, incluyendo también aquella de otros factores de transcripción hepáticos.	Proteína expresada en el hígado evaluada mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>HNF1a</b>	Factor de transcripción que forma parte del sistema transcripcional hepático y cuya presencia también es esencial para el metabolismo en general.	Proteína expresada en el hígado evaluada mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua

<b>CEBPa</b>	Factor de transcripción que forma parte del sistema transcripcional hepático, con función conocida en la regulación de genes que controlan la glucosa, lípidos y bilirrubina en el hígado.	Proteína expresada en el hígado evaluada mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>FOXA2</b>	Factor de transcripción que forma parte del sistema transcripcional hepático con funciones en el metabolismo de la glucosa y la regulación de otros factores de transcripción hepáticos	Proteína expresada en el hígado evaluada mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>Ciclina D (CCND1)</b>	Proteína que controla la fase G1 del ciclo celular, junto con otros factores como Rb/E2F.	Proteína expresada en el hígado evaluada mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>Rb1</b>	Proteína del retinoblastoma importante en la fase G1 del ciclo celular al regular la actividad del factor de transcripción E2F.	Proteína expresada en el hígado evaluada mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>p16 (CDKN2A)</b>	Proteína que inhibe la actividad de Cdk4 y Cdk6, controlando así la fase G1 del ciclo celular.	Proteína expresada en el hígado evaluada mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>Ciclina B (CCNB1)</b>	Proteína que controla la fase M del ciclo celular.	Proteína expresada en el hígado evaluada mediante PCR cuantitativa.	Expresión relativa/18s	Cuantitativa continua
<b>Pruebas de funcionamiento hepático</b>	Conjunto de análisis de laboratorio en el que se evalúan elementos específicos del hígado.	Datos obtenidos a partir de los resultados de análisis de laboratorios proporcionados por el Sistema Integral de Laboratorios del INCMNSZ.	Bilirrubina total (mg/dL) AST, ALT (U/L) Albúmina, proteínas, globulinas (g/dL) Fosfatasa alcalina (mg/dL)	Cuantitativa continua

<b>Química sanguínea</b>	Conjunto de análisis de laboratorio que proporcionan información sobre componentes disueltos en la sangre.	Datos obtenidos a partir de los resultados de análisis de laboratorios proporcionados por el Sistema Integral de Laboratorios del INCMNSZ.	Glucosa, nitrógeno ureico, urea, creatinina (mg/dL)	Cuantitativa continua
<b>Biometría hemática</b>	Análisis de laboratorio con los que se evalúa la cantidad y variaciones de los elementos sanguíneos.	Datos obtenidos a partir de los resultados de análisis de laboratorios proporcionados por el Sistema Integral de Laboratorios del INCMNSZ.	Leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) Eritrocitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) Hemoglobina (g/dL) Plaquetas (K/ $\mu\text{L}$ ) linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos (%).	Cuantitativa continua
<b>Tiempos de coagulación</b>	Conjunto de análisis de laboratorio que proporcionan información sobre el funcionamiento de los factores de coagulación y plaquetas.	Datos obtenidos a partir de los resultados de análisis de laboratorios proporcionados por el Sistema Integral de Laboratorios del INCMNSZ.	INR; tiempo de protrombina y tiempo de trombina (%)	Cuantitativa continua
<b>Model for End-Stage Liver Disease-sodium (MELD-Na)</b>	Puntaje que integra los valores de creatinina, bilirrubina, INR y sodio sérico para evaluar la probabilidad de mortalidad del paciente a corto plazo.	Dato obtenido con la calculadora de MELD-Na a partir de los resultados de análisis de laboratorios proporcionados por el Sistema Integral de Laboratorios del INCMNSZ.	Unidad arbitraria. El puntaje mínimo es 6 y el máximo 40.	Cuantitativa continua

<b>Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)</b>	Condición patológica presente cuando se cumplen por lo menos dos de los siguientes criterios: temperatura < 36°C o > 38°C; frecuencia cardiaca > 90 latidos por minuto; frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto; y cuenta de leucocitos < 4 ×10 <sup>9</sup> /L o > 12 ×10 <sup>9</sup> /L.	Dato calculado a partir de las constantes vitales reportadas en el expediente del paciente y los resultados de análisis de laboratorios proporcionados por el Sistema Integral de Laboratorios del INCMNSZ.	0= No 1= Sí	Cualitativa nominal dicotómica
<b>Variables antecedentes</b>				
<b>Sexo</b>	Condición anatómica que distingue al hombre de la mujer.	Dato obtenido a partir del expediente del paciente.	0= femenino 1= masculino	Cualitativa nominal dicotómica
<b>Edad</b>	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento del individuo hasta el presente.	Dato obtenido a partir del expediente del paciente.	Años	Cuantitativa continua
<b>Etiología</b>	Causa principal que ocasionó el desarrollo de enfermedad hepática y cirrosis.	Dato obtenido a partir del expediente del paciente.	1= enfermedad autoinmune 2= virus de hepatitis C 3= enfermedad hepática alcohólica 4= esteatohepatitis no alcohólica 5= criptogénico 6= otro	Cualitativa nominal politómica
<b>Ascitis</b>	Acumulación de líquido libre en la cavidad abdominal como resultado de hipertensión portal.	Dato obtenido a partir del expediente del paciente.	0= No 1= Sí	Cualitativa nominal dicotómica
<b>Encefalopatía hepática</b>	Alteración del estado neurológico como	Dato obtenido a partir del expediente del	0= No 1= Sí	Cualitativa nominal

	consecuencia de la acumulación de amonio debido a disfunción hepática.	paciente.		dicotómica
<b>Hemorragia gastrointestinal</b>	Sangrado del tubo digestivo alto o bajo como consecuencia de la hipertensión portal.	Dato obtenido a partir del expediente del paciente.	0= No 1= Sí	Cualitativa nominal dicotómica
<b>Variables de desenlace</b>				
<b>Trasplante hepático ortotópico</b>	Procedimiento quirúrgico que se realiza en pacientes cirróticos con enfermedad avanzada.	Dato obtenido a partir del expediente del paciente.	0= No 1= Sí	Cualitativa nominal dicotómica
<b>Muerte</b>	Ausencia de signos vitales; cese de la vida.	Nota de defunción del expediente del paciente.	0= No 1= Sí	Cualitativa nominal dicotómica
<b>Complicaciones infecciosas del postrasplante</b>	Cualquier tipo de infección adquirida durante la estancia hospitalaria, relacionada o no con el procedimiento quirúrgico o con el donador, en el periodo inmediato del postrasplante hasta el egreso del paciente	Dato obtenido a partir del expediente del paciente.	0= No 1= Sí	Cualitativa nominal dicotómica

### 3. METODOLOGÍA

El presente protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), con número de registro GAS-2368-17-20 y GAS-2247-17/19-1, y cumple con los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki. Todos los estudios que involucraron el análisis de muestras biológicas se realizaron bajo consentimiento informado obtenido del paciente y/o sus familiares. Ningún hígado de donador cadavérico se obtuvo de presos ejecutados u otras personas institucionalizadas.

#### 3.1 PACIENTES Y RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS

Se revisó el expediente clínico físico y electrónico de pacientes que recibieron trasplante hepático ortotópico en el Instituto, desde el 2015 al 2019. Los pacientes son considerados candidatos al trasplante de acuerdo con un consenso interdisciplinario alcanzado por las especialidades de gastroenterología, cardiología, neumología, infectología, otorrinolaringología, psiquiatría, cirugía, anestesiología y estomatología. Se asigna prioridad en la lista de espera de acuerdo con una evaluación irrestricta de los scores MELD, MELD-Na y CLIF-C. Aquellos pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) reciben puntos adicionales considerando el momento de inicio de esta entidad. Los pacientes fueron clasificados según la gravedad de la cirrosis en cirrosis compensada (CC), cirrosis descompensada (DC) o insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF). El diagnóstico de CC o DC se consideró de acuerdo con la ausencia o presencia de síntomas relacionados con la hipertensión portal, incluyendo ascitis, encefalopatía, o sangrado gastrointestinal, respectivamente. Todos los pacientes con CC recibieron trasplante por indicación de HCC. Para el diagnóstico de ACLF, se utilizó la definición del estudio CANONIC (27) como se describe a continuación.

##### 3.1.1 Criterios diagnósticos de ACLF y clasificación de la gravedad

ACLF se diagnosticó de acuerdo con la presencia de fallas orgánicas (OFs) tanto hepática (bilirrubina total  $> 12\text{mg/dL}$ ) como extrahepáticas (renal [creatinina  $\geq 2\text{ mg/dL}$ ], cerebral [encefalopatía grado 3 o 4 de acuerdo con los criterios de West-Haven], coagulación [INR  $\geq 2.5$ ], circulación [uso de vasopresores debido a falla circulatoria] o pulmonar [ $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ , o  $\text{SpO}_2/\text{FiO}_2 \leq 214$  o ventilación mecánica debido a falla pulmonar]). La gravedad fue evaluada *en cada evento de ACLF* de acuerdo también con lo establecido por el estudio CANONIC: ACLF-1, pacientes con OF única renal o una OF no renal asociada a disfunción renal (creatinina entre 1.5 y 1.9 mg/dL) y/o disfunción cerebral (encefalopatía grado 1 o 2 de acuerdo con los criterios de West-Haven); ACLF-2, pacientes con dos OFs; y ACLF-3, pacientes con tres o más OFs.

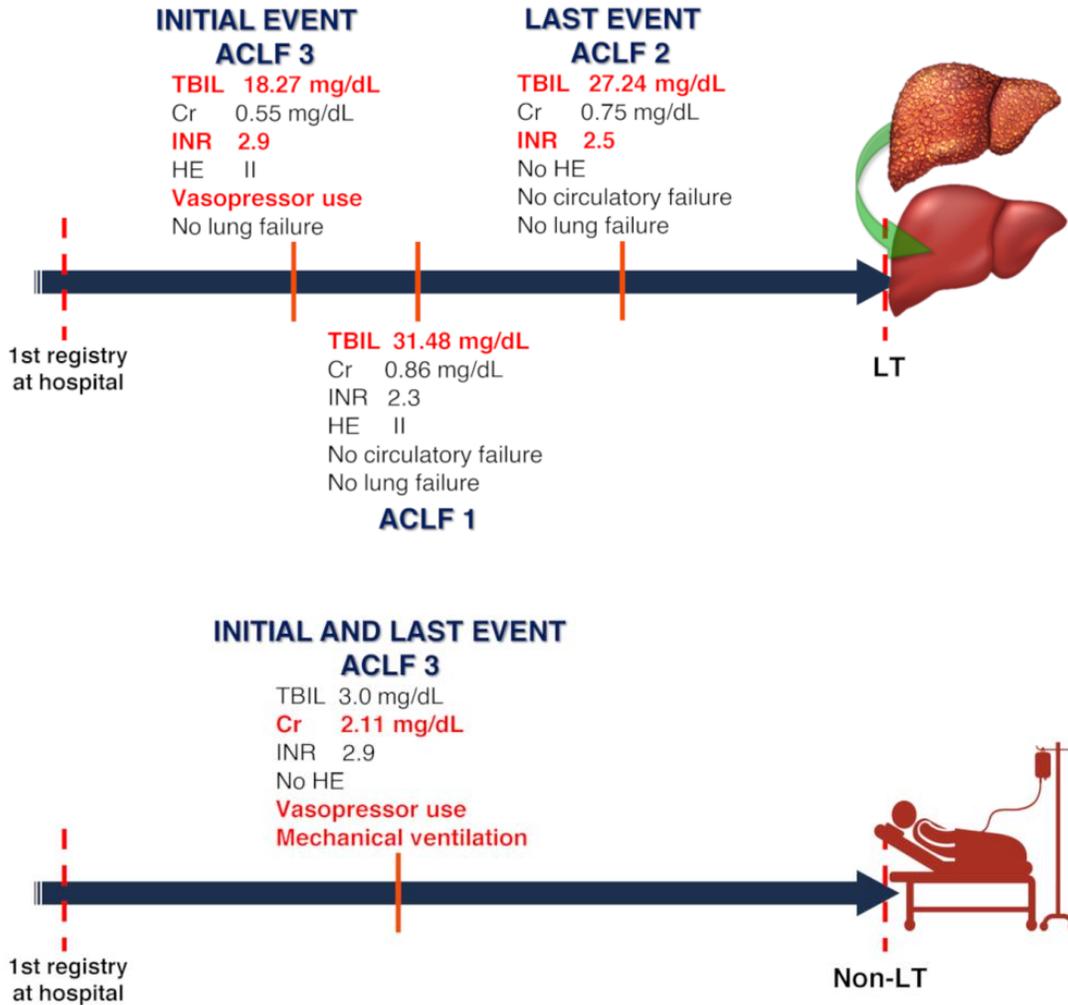
##### 3.1.2 Descripción de las poblaciones de ACLF y determinación de los eventos de ACLF

Con el fin de caracterizar el curso clínico de los pacientes diagnosticados con ACLF e identificar factores asociados con el beneficio del trasplante hepático, se llevaron a cabo

comparaciones entre los pacientes con ACLF que fueron trasplantados y un grupo de aquellos con ACLF que no fueron trasplantados conformado por: a) pacientes que fueron evaluados y considerados como candidatos al trasplante pero fallecieron antes de recibirlo; b) pacientes que fueron evaluados pero se decidió que no eran candidatos al trasplante; y c) pacientes que no pudieron ser evaluados, principalmente debido a enfermedad avanzada que culminó en defunción. Con fines explicativos, aquellos que no fueron trasplantados debido a la razón a) constituyen el subgrupo de pacientes elegibles al trasplante mientras que los que no se trasplantaron por las razones b) y c) se juntaron como el subgrupo de pacientes no elegibles al trasplante.

La historia natural de los pacientes con ACLF trasplantados y no trasplantados fue analizada registrando *cada evento de ACLF* que ocurrió durante la ventana entre su primer registro en el Instituto hasta el día de su trasplante o fallecimiento (**Figura 7**). Por lo tanto, se determinó como “evento inicial” aquel primer evento de descompensación que cumplía con criterios de ACLF de acuerdo con el consorcio EASL-CLIF (27) y “último evento” aquel episodio final de ACLF que se presentó antes o durante el desenlace del paciente. La duración de cada evento de ACLF y el tiempo entre eventos se documentó también. El fin de un evento de ACLF se consideró cuando el paciente ya no cumplía con los criterios diagnósticos. Los pacientes cuyo expediente clínico sugería que su evento inicial pudiera haber ocurrido en otro hospital y/o no se contaba con información completa se excluyeron.

**FIGURA 7**



**Figura 7. Los pacientes con ACLF presentan un curso clínico dinámico.** La historia natural de los pacientes con ACLF, trasplantados y no trasplantados, se estudió analizando retrospectivamente los expedientes clínicos y datos de laboratorio, desde su primer registro en el hospital hasta su desenlace (fallecimiento o trasplante) como se simboliza con las flechas en azul. Las líneas perpendiculares a estas flechas representan eventos de ACLF, siendo particularmente relevantes para el estudio el evento inicial y el último. En el caso de pacientes que solo presentaron un evento, ese mismo se consideró en los análisis como evento inicial y último. Los parámetros necesarios para determinar el cumplimiento de los criterios diagnósticos para ACLF fueron examinados en cada evento, así como la clasificación de la gravedad. Abreviaciones: ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; Cr, creatinina; HE, encefalopatía hepática; ICU, terapia intensiva; INR, international normalized ratio; LT, trasplante hepático; TBIL, bilirrubina total.

### **3.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Se recolectaron muestras de hígado y suero de los pacientes durante su trasplante hepático. Todos los pacientes contaban con diagnóstico de cirrosis basado en estudios de imagen y/o biopsia hepática y se confirmó posterior al trasplante de manera histológica con muestras del explante. Se analizó un total de 9 pacientes con CC, 59 con DC y 61 con ACLF. El suero se alicuotó y almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ , mientras que las muestras de hígado se preservaron inmediatamente en formol o en la solución estabilizadora RNAlater™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EU) y almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Como controles, se analizaron muestras de hígado de los donadores cadavéricos (n= 38) y el suero de sujetos sanos (n= 10).

Adicionalmente se examinaron datos de secuenciación de ARN (RNAseq) de muestras de hígado procuradas *al momento del diagnóstico* de pacientes con hepatitis alcohólica (AH) temprana (n= 12) y grave (n= 25) confirmada por la historia clínica y una evaluación histopatológica de esteatohepatitis alcohólica para corroborar los resultados obtenidos. Estos datos se originan del estudio de Argemi y colaboradores (87) y las muestras de hígado son parte del *Human Biorepository Core* del consorcio internacional InTeam financiado por el NIH (7U01AA021908-05). Como controles, se usaron los datos de RNAseq de hígado humano normal (n= 10).

### **3.3 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

Los niveles de galectina-3 se midieron en el suero de los pacientes con CC, DC y ACLF recolectado inmediatamente antes de recibir un trasplante hepático. Muestras de sujetos sanos ajustados a la edad de los pacientes con cirrosis (n= 10) sirvieron como controles. Las mediciones se realizaron con un kit de ELISA comercial para galectina-3 humana (Invitrogen Catalog #BMS279-4, Carlsbad, CA, EU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se analizaron en duplicado. Se obtuvo un coeficiente de variación inter-ensayo de 7.77% e intra-ensayo de 8.67%

### **3.4 EXTRACCIÓN DE ARN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA**

Se extrajo ARN total de las muestras de hígado preservadas y almacenadas de los pacientes y donadores cadavéricos mediante método de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo utilizando la solución comercial TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, EU). La cantidad y pureza del ARN se analizó con el espectrofotómetro Nano-Drop™ ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EU) y su integridad se comprobó por electroforesis en geles de agarosa 1%-formaldehído. Posteriormente se convirtió el ARN a ADN complementario por reacción de transcriptasa inversa usando el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), el cual se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa con el kit LightCycler TaqMan Master Mix (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) y un sistema LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) para determinar la

expresión por ARN mensajero de los genes analizados. Cada muestra se analizó por duplicado y los resultados se expresaron en términos de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para esta cuantificación relativa, los valores del ciclo umbral (Ct) de cada muestra se normalizaron de acuerdo con la expresión del gen constitutivo 18s y se compararon con la muestra de un control sano. Esta muestra calibradora corresponde a la de un paciente de 18 años sin disfunción hepática que falleció de traumatismo craneoencefálico, cuyo *Donor Risk Index* fue de 1.25. A continuación se muestran los *primers* o cebadores utilizados en estos análisis (T4 Oligo, Guanajuato, México):

<b>Inmunidad innata</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>LGALS3</b> (Galectina-3) <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-CTTCTGGACAGCCAAGTGC-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-AGGCAGGTTATAAGGCACAATC-3'</li> </ul> </li> <li>• <b>IL6</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-GAAAGTGGCTATGCAGTTTGAA-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-GAGGTAAGCCTACACTTTCCAAGA-3'</li> </ul> </li> <li>• <b>MCP1</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-TCAAAGCTGAAGCTCGCACTCT-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-GTGACTGGGGCATTGATTG-3'</li> </ul> </li> <li>• <b>MCSF</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-GTCGGAGGCCTCTTGTTCTA-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-CGCTCTCTGAGGCTCTTGAT-3'</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>IL8</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-GAGCACTCCATAAGGCACAAA-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-ATGGTTCCTTCCGGTGGT-3'</li> </ul> </li> <li>• <b>CD66b</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-GTGACCCAGTCACCCTGAA-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-AATACTGTGAGGGTGGATTAGAGG-3'</li> </ul> </li> <li>• <b>MPO</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-ATCACCGGGATGTGCAAC-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-GAAGAGAGAAGCCGTCCTCA-3'</li> </ul> </li> </ul>
<b>Sistema transcripcional hepático</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>HNF4A</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-TCGTTGAGTGGGCCAAGTA-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-CCTTGAACACCATGGATCTCT-3'</li> </ul> </li> <li>• <b>HNF1A</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-GTGACCCAGAGCCCCTTC-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-GGGCTTGTGGCTGTAGAGG-3'</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FOXA2</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-GGGTGATTGCTGGTCGTTT-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-ATACTGGAAGCCGAGTGCAT-3'</li> </ul> </li> <li>• <b>CEBPa</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward</i>: 5'-GGAGCTGAGATCCCGACA-3'</li> <li>○ <i>reverse</i>: 5'-TTCTAAGGACAGGCGTGGAG-3'</li> </ul> </li> </ul>

<b>Ciclo celular</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>CCNB1</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward:</i> 5'-CATGGTGCACCTTCCTCCTT-3'</li> <li>○ <i>reverse:</i> 5'-AGGTAATGTTGTAGAGTTGGTGTCC-3'</li> </ul> </li> <li>• <i>CCND1</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward:</i> 5'-GCTGTGCATCTACACCGACA-3'</li> <li>○ <i>reverse:</i> 5'-GCCAGGTTCCACTTGAGC-3'</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>CDKN2A (p16)</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward:</i> 5'-CACATTCATGTGGGCATTTTC-3'</li> <li>○ <i>reverse:</i> 5'-TGCTTGTGCATGAAGTCGACAG-3'</li> </ul> </li> <li>• <i>Rb1</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward:</i> 5'-AATTGGAAAGGACATGTGAACTTAT-3'</li> <li>○ <i>reverse:</i> 5'-CCAATGCAGAATTTATTTTCAGTAGATA-3'</li> </ul> </li> </ul>
<b>Gen constitutivo</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>18s</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>forward:</i> 5'-CGATTGGATGGTTTAGTGAGG-3'</li> <li>○ <i>reverse:</i> 5'-AGTTCGACCGTCTTCTCAGC-3'</li> </ul> </li> </ul>	

### 3.5 INMUNOHISTOQUÍMICA Y CUANTIFICACIÓN DE GALECTINA-3

Se realizaron cortes histológicos de 3 µm de las muestras de hígado preservadas en formol y posteriormente embebidas en parafina, provenientes de los pacientes con CC (n= 4), DC (n= 14) y ACLF (n= 26), así como de los donadores cadavéricos (n= 3). Los tejidos se desparafinizaron en baños de xileno y rehidrataron en gradientes de etanol. Después se realizó recuperación antigénica hirviendo los tejidos en solución de citrato de sodio 10 mM, pH 6.0. Las peroxidasas endógenas se inhibieron incubando con peróxido de hidrógeno al 3% y luego se bloquearon los tejidos con albúmina de suero bovino al 0.1%. En seguida se dejó incubando toda la noche a 4°C con anticuerpo primario (ver tabla a continuación). La siguiente incubación se hizo con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano o a fosfatasa alcalina (ver tabla) y la actividad de esta enzima se reveló con 3,3'-diaminobenzidina (Dako K3468, Glostrup, Denmark) y/o con Vulcan Fast Red Chromogen Kit (Biocare, FR805). La contratinción de las laminillas se realizó tiñendo con hematoxilina de Harris (Reasol, Mexico).

Para los análisis cuantitativos con las laminillas teñidas para galectina-3 se escogieron al azar 5 campos con magnificación 10x y el porcentaje de células altamente positivas (hepatocitos y colangiocitos) se cuantificó con el software Fiji para análisis de imágenes (88). La media de cada laminilla se usó en los análisis finales. Los paneles con imágenes representativas de las inmunotinciones se realizaron con el software FigureJ (89).

Anticuerpo primario	Proveedor	Catálogo	Concentración
Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse/human Mac-2 (Galectin-3) Clone M3/38; Biolegend, San Diego, CA	Biolegend	125401, RRID:AB_1134237	0.01 mg/mL
Rabbit anti-human p15/p16 (H-43)	Santa Cruz	sc-28260, RRID:AB_2078593	200 µg/mL
Rabbit anti-human p53 (FL-393)	Santa Cruz	sc-6243, RRID:AB_653753	200 µg/mL

Anticuerpo secundario	Proveedor	Catálogo	Concentración
Goat Anti-Rat IgG-HRP	SouthernBiotech	3030-05, RRID:AB_2716837	0.01 mg/mL
Goat Anti-Rabbit IgG-AP ((H+L) Conjugate)	Invitrogen	81-6122, RRID:AB_87820	1.5 mg/mL

### 3.6 RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS Y DEFINICIONES

El expediente clínico y los datos de laboratorio de todos los pacientes se examinaron para recolectar variables demográficas (sexo, edad y etiología de la cirrosis) y aquellas clínicas y bioquímicas en cada evento de ACLF, incluyendo los datos reportados inmediatamente previo al trasplante hepático. Dentro de estas se encuentran: bilirrubina total, creatinina, encefalopatía de acuerdo con los criterios de West-Haven, INR, uso de vasopresores, relación de la PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> o SpO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> y requerimiento de ventilación mecánica. Estas variables se usaron en el estudio demográfico para computar el score MELD-Na (Model for End-Stage Liver Disease-Sodium) en el evento inicial, así como el score CLIF-C OF y ACLF (Chronic Liver Failure Consortium) de acuerdo con las fórmulas publicadas (37). Para el estudio sobre la utilidad clínica de galectina-3, se evaluó también si los pacientes presentaban síndrome de respuesta inflamatoria sistémica al cumplir con por lo menos dos de los siguientes criterios: temperatura < 36°C o > 38°C; frecuencia cardiaca > 90 latidos por minuto; frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto; y cuenta de leucocitos < 4 ×10<sup>9</sup>/L o > 12 ×10<sup>9</sup>/L. Además, se evaluó el desarrollo de complicaciones infecciosas durante la estancia hospitalaria inmediatamente después del trasplante hepático hasta el egreso del paciente (mediana de 9.5 días [IQR 7.0 – 14.0]), incluyendo cualquier tipo de infección nosocomial o derivada del donador o relacionada con el procedimiento quirúrgico.

### 3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se reportan como frecuencias para las variables categóricas y como medias con desviación estándar (SD) o medianas con rango intercuartil (IQR, percentila 25 a percentila 75)

para las variables cuantitativas de acuerdo con su distribución normal. Se usaron pruebas t de Student o U de Mann-Whitney para comparaciones estadísticas univariadas simples y las pruebas ANOVA o Kruskal-Wallis para comparaciones univariadas múltiples entre variables cuantitativas. Se llevaron a cabo comparaciones univariadas entre variables categóricas con la prueba  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher. En el caso de comparaciones univariadas entre variables categóricas pareadas se usó la prueba de McNemar. Los análisis de correlación se hicieron con el coeficiente de Pearson o Spearman entre pares de variables continuas. Se graficaron curvas ROC (*receiver operating characteristic curve*, por sus siglas en inglés) para determinar el poder de discriminación de la galectina-3 para cirrosis avanzada y complicaciones infecciosas en el postrasplante. Como puntos de corte se escogieron aquellos valores con el índice de Youden más alto con su correspondiente sensibilidad y especificidad. Se realizaron adicionalmente análisis univariados de riesgos proporcionales de Cox para determinar la asociación de galectina-3 con el riesgo de desarrollar complicaciones infecciosas en el periodo postrasplante en general y en un subanálisis de pacientes que ya se encontraban hospitalizados al momento de recibir un trasplante debido a que estaban siendo tratados por algún evento de descompensación. La modificación de efecto entre galectina-3 sérica, el MELD-Na y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica se determinó utilizando términos de interacción multiplicativos. Para evaluar la supervivencia, se graficaron curvas de Kaplan-Meier usando R versión 4.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria; [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) con el paquete *survminer* y se compararon con la prueba de log-rank con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los demás análisis se ejecutaron con el programa estadístico SPSS versión 24.0 para Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA) y con el programa GraphPad Prism versión 9.1 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS GENERALES

A continuación, presento los manuscritos principales que resultan de este proyecto doctoral. En el primero se realizó el estudio demográfico de pacientes que recibieron trasplante hepático en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán entre el 1ro de enero de 2015 y el 31 de diciembre de 2019, reportando la frecuencia de pacientes que desarrollaron ACLF y analizando diferencias en la gravedad de la enfermedad y en la supervivencia posterior al trasplante con respecto al resto de pacientes clasificados como CC o DC. En el segundo manuscrito se estudió en específico a la población de ACLF y su curso clínico, para lo cual se realizó una comparación con otro grupo de pacientes con ACLF del Instituto los cuales no pudieron ser trasplantados. Por último se muestra el estudio que se realizó a la par, analizando en específico la expresión de galectina-3 en muestras de los pacientes con ACLF, CC y DC trasplantados, con el fin de determinar su utilidad como marcador biológico para identificar en la clínica aquellos con cirrosis avanzada, y proponer también su uso en la predicción de complicaciones infecciosas en el periodo inmediato del postrasplante.

### 4.1 EL TRASPLANTE HEPÁTICO ES BENÉFICO INDEPENDIENTEMENTE DEL ESTADIO DE CIRROSIS O EL GRADO DE INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA SOBRE CRÓNICA

#### 4.1.1 Características de pacientes con ACLF trasplantados y no trasplantados

De un total de 244 pacientes que fueron sometidos a trasplante hepático entre el 1ro de enero de 2015 y el 31 de diciembre de 2019, 235 se incluyeron en este estudio de los cuales 95 (38.9%) cumplieron con criterios de ACLF, 129 (52.9%) fueron clasificados como DC y 11 (4.5%) como CC (**Tabla 1**). En comparación con el estudio CANONIC, se encontró que esta población de pacientes trasplantados en el INCMNSZ fue por lo general más joven, siendo los pacientes con ACLF más jóvenes que aquellos con DC y CC (50.0 años [IQR 37.0 – 59.0] vs. 52.0 años [IQR 43.0 – 61.0] y 57.0 años [IQR 53.0 – 59.0], respectivamente;  $p= 0.02$ ). Las etiologías autoinmunes (hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y síndromes de sobreposición) fueron las más frecuentes en los pacientes con ACLF (44.2% vs. 27.9% DC, y 9.1% CC;  $p< 0.01$ ), mientras que la causa principal de cirrosis en los pacientes con DC y CC fue la infección por el virus de hepatitis C (VHC) (72.7% CC, 32.6% DC, y 13.7% ACLF;  $p< 0.0001$ ). Con respecto a la presencia de comorbilidades, las frecuencias tanto de diabetes tipo 2 como de hipertensión arterial no fueron estadísticamente diferentes entre los diferentes grupos de cirrosis ( $p= 0.44$  and  $p= 0.06$ , respectivamente). Los pacientes con ACLF tuvieron el score MELD-Na más alto ( $25 \pm 6$  vs.  $19 \pm 4$  y  $11 \pm 3$ , DC y CC respectivamente), y de manera concordante los valores más altos de bilirrubina total y creatinina. La presencia de ascitis y encefalopatía (incluyendo encefalopatía grado 3 – 4 de West-Haven) también fue significativamente más frecuente en pacientes con ACLF (**Tabla 1**).

Al analizar a los pacientes con ACLF en su último evento antes de recibir un trasplante hepático, la mayoría presentó ACLF grado 1 (n= 40 [42.1%]) seguido de ACLF-2 (n= 33 [34.7%]) y ACLF-3 (n= 22 [23.2%]) (**Tabla 2**). La mediana de tiempo hasta ser trasplantados desde este último evento de ACLF fue de 31 días (IQR 11.0 – 88-0). Sin embargo, aquellos con ACLF-1 tardaron significativamente más en ser trasplantados comparado con los pacientes con ACLF-2 y ACLF-3 (54.0 [IQR 21.3 – 122.8] vs. 31.0 [IQR 7.0 – 59.5] y 22.0 [IQR 9.5 – 46.8], respectivamente;  $p= 0.03$ ). Los datos demográficos y las etiologías fueron similares entre estos tres grupos, siendo las etiologías autoinmunes las más frecuentes entre todos los grados de ACLF ( $p= 0.30$ ). El precipitante de ACLF más común fueron las infecciones bacterianas y la ausencia de un factor identificable (precipitante desconocido). Otros precipitantes incluyeron complicaciones asociadas con fármacos o procedimientos, las cuales fueron más comunes en pacientes con ACLF-1 ( $p= 0.01$ ). La falla orgánica (OF) renal fue la única que no fue significativamente diferente entre los tres grupos de ACLF (18 (45.0%) ACLF-1, 11 (33.3%) ACLF-2, y 14 (63.6%) ACLF-3;  $p= 0.09$ ), mientras que las fallas hepática, cerebral, de la coagulación, circulación y pulmonar fueron más frecuentes en ACLF-3 (**Tabla 2**).

Los parámetros que reflejan la gravedad de la enfermedad, incluyendo los scores MELD-Na, CLIF-C OF y CLIF-C ACLF, la bilirrubina total, el INR y la cuenta de leucocitos fueron más elevados en aquellos con ACLF-3 y más bajos en aquellos con ACLF-1. Se observó una mejoría generalizada en los pacientes con ACLF de los parámetros clínicos al momento de ser trasplantados, con una reducción concomitante de los tres scores de gravedad de la enfermedad evaluados. Por ejemplo, el MELD-Na disminuyó significativamente entre todos los pacientes con ACLF ( $p < 0.01$ ) y también hubo una mejoría del score CLIF-C OF. De manera interesante, el score CLIF-C ACLF se volvió similar al momento del trasplante entre los pacientes con ACLF-1, 2 y 3 sin haber alguna diferencia significativa entre ellos ( $p= 0.18$ ) y lo mismo ocurrió con el INR y la cuenta de leucocitos ( $p= 0.05$  y  $p= 0.92$ , respectivamente) (**Tabla 2**).

**TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS.**

**POBLACIÓN GENERAL CON TRASPLANTE HEPÁTICO EN EL INCMNSZ, 2015 – 2019 (n= 235)**

	<b>Pacientes CC</b> n= 11 (4.5%)	<b>Pacientes DC</b> n= 129 (52.9%)	<b>Pacientes ACLF</b> n= 95 (38.9%)	<b>p</b>
Sexo masculino, n (%)	6 (54.5%)	64 (49.6%)	47 (49.5%)	0.95
Edad, años	57 (53-59) <sup>a</sup>	52 (43-61) <sup>c</sup>	50 (37-59) <sup>a,c</sup>	0.02
<b>Etiología de la cirrosis, n (%)</b>				
Autoinmune †	1 (9.1%) <sup>a</sup>	36 (27.9%) <sup>c</sup>	42 (44.2%) <sup>a,c</sup>	< 0.01
VHC	8 (72.7%) <sup>a,b</sup>	42 (32.6%) <sup>b,c</sup>	13 (13.7%) <sup>a,c</sup>	< 0.0001
Enfermedad hepática alcohólica	1 (9.1%)	11 (8.5%)	9 (9.5%)	0.93
NASH	0 (0.0%)	7 (5.4%)	6 (6.3%)	0.88
Criptogénica	1 (9.1%)	22 (17.1%)	18 (18.9%)	0.76
Otras ‡	0 (0.0%)	11 (8.5%)	7 (7.4%)	0.84
<b>Comorbilidades</b>				
Diabetes tipo 2	3 (27.3%)	22 (17.1%)	13 (13.7%)	0.44
Hipertensión arterial	2 (18.2%)	20 (15.5%)	6 (6.3%)	0.06
<b>Datos clínicos pretrasplante</b>				
MELD-Na	11 ± 3 <sup>a,b</sup>	19 ± 4 <sup>b,c</sup>	25 ± 6 <sup>a,c</sup>	< 0.0001
Bilirrubina total (mg/dL)	1.18 (1.03 – 1.45) <sup>a,b</sup>	3.39 (2.3 – 5.46) <sup>b,c</sup>	7.70 (4.14 – 16.63) <sup>a,c</sup>	< 0.0001
INR	1.1 (1.1 – 1.2) <sup>a,b</sup>	1.5 (1.3 – 1.7) <sup>b</sup>	1.5 (1.3 – 2.0) <sup>a</sup>	< 0.0001
Creatinina (mg/dL)	0.67 (0.57 – 0.71) <sup>a</sup>	0.73 (0.61 – 0.88) <sup>c</sup>	0.97 (0.75 – 1.35) <sup>a,c</sup>	< 0.0001
Leucocitos (×10 <sup>9</sup> /L)	2.9 (2.4 – 3) <sup>a</sup>	4 (3.1 – 5) <sup>c</sup>	5.4 (3.8 – 6.8) <sup>a,c</sup>	< 0.0001
<b>Manifestaciones clínicas</b>				
Ascitis clínica	0 (0.0%) <sup>a,b</sup>	88 (68.2%) <sup>b,c</sup>	88 (92.6%) <sup>a,c</sup>	< 0.0001
Encefalopatía	0 (0.0%) <sup>a,b</sup>	69 (53.5%) <sup>b,c</sup>	80 (84.2%) <sup>a,c</sup>	< 0.0001
Encefalopatía grado 3-4 (West-Haven)	0 (0.0%) <sup>a,b</sup>	7 (5.4%) <sup>b,c</sup>	37 (38.9%) <sup>a,c</sup>	< 0.0001

† Incluye hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y síndromes de sobreposición.

‡ Otras etiologías incluyen cirrosis biliar secundaria, daño hepático inducido por fármacos (DILI), y enfermedades hepáticas congénitas.

Los datos se reportan como n (%), medias (SD) y medianas (IQR). Comparaciones significativas se muestran entre CC y ACLF (<sup>a</sup>), CC y DC (<sup>b</sup>), y DC y ACLF (<sup>c</sup>). ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; CC, cirrosis compensada; DC, cirrosis descompensada; VHC, virus de la hepatitis C; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; MELD-Na, Model for End-Stage Liver Disease-Sodium; INR, International Normalized Ratio.

**TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON ACLF SUBDIVIDOS POR GRADO DE ACLF (n= 95)**

	<b>ACLF-1</b> n= 40 (42.1%)	<b>ACLF-2</b> n= 33 (34.7%)	<b>ACLF-3</b> n= 22 (23.2%)	<b>p</b>
Sexo masculino, n (%)	21 (52.5%)	17 (51.5%)	11 (50.0%)	0.98
Edad, años	55.0 (39.8 – 60.0)	44.0 (36.5 – 53.0)	49.0 (37.5 – 59.3)	0.14
Tiempo al trasplante	54.0 (21.3 – 122.8) <sup>a,b</sup>	31.0 (7.0 – 59.5) <sup>b</sup>	22.0 (9.5 – 46.8) <sup>a</sup>	0.03
<b>Etiología de la cirrosis, n (%)</b>				
Autoinmune †	14 (35.0%)	17 (51.5%)	11 (50.0%)	0.30
VHC	9 (22.5%)	2 (6.1%)	2 (9.1%)	0.14
Enfermedad hepática alcohólica	2 (5.0%)	4 (12.1%)	3 (13.6%)	0.44
NASH	3 (7.5%)	2 (6.1%)	1 (4.5%)	0.99
Criptogénica	10 (25.0%)	5 (15.2%)	3 (13.6%)	0.50
Otras ‡	2 (5.0%)	3 (9.1%)	2 (9.1%)	0.69
<b>Precipitante del evento de ACLF §</b>				
Infección bacteriana	14 (35.0%)	16 (48.5%)	11 (50.0%)	0.39
Hemorragia gastrointestinal	1 (2.5%)	3 (9.1%)	1 (4.5%)	0.44
Alcoholismo activo	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.99
Otro	10 (25.0%) <sup>a</sup>	2 (6.1%)	0 (0.0%) <sup>a</sup>	0.01
Desconocido	15 (37.5%)	12 (36.4%)	10 (45.5%)	0.77
<b>Fallas orgánicas §</b>				
Hepática	14 (35.0%) <sup>a,b</sup>	22 (66.7%) <sup>b</sup>	16 (72.7%) <sup>a</sup>	< 0.01
Renal	18 (45.0%)	11 (33.3%)	14 (63.6%)	0.09
Cerebral	5 (12.5%) <sup>a</sup>	10 (30.3%)	11 (50.0%) <sup>a</sup>	< 0.01
Coagulación	3 (7.5%) <sup>a,b</sup>	12 (36.4%) <sup>b</sup>	11 (50.0%) <sup>a</sup>	< 0.001
Circulación	0 (0.0%) <sup>a,b</sup>	8 (24.2%) <sup>b,c</sup>	14 (63.6%) <sup>a,c</sup>	< 0.0001
Pulmonar	1 (2.5%) <sup>a</sup>	3 (9.1%)	7 (31.8%) <sup>a</sup>	< 0.01
<b>Datos clínicos del evento de ACLF §</b>				
MELD-Na	27 ± 4 <sup>a,b</sup>	29 ± 5 <sup>b,c</sup>	35 ± 4 <sup>a,c</sup>	< 0.0001
CLIF-C OF	9 ± 1 <sup>a,b</sup>	10 ± 1 <sup>b,c</sup>	12 ± 2 <sup>a,c</sup>	< 0.0001

CLIF-C ACLF	39 ± 8 <sup>a</sup>	43 ± 6 <sup>c</sup>	52 ± 6 <sup>a,c</sup>	< 0.0001
Bilirrubina total (mg/dL)	6.31 (2.99 – 12.91) <sup>a,b</sup>	13.07 (6.39 – 22.31) <sup>b</sup>	23.08 (10.56 – 27.76) <sup>a</sup>	< 0.001
INR	1.5 (1.2 – 1.9) <sup>a,b</sup>	1.9 (1.4 – 2.5) <sup>b</sup>	2.2 (1.7 – 2.8) <sup>a</sup>	< 0.001
Creatinina (mg/dL)	1.86 (1.18 – 2.27) <sup>b</sup>	0.93 (0.71 – 1.99) <sup>b,c</sup>	2.25 (1.42 – 2.87) <sup>c</sup>	< 0.01
Leucocitos (×10 <sup>9</sup> /L)	6.55 (4.73 – 9.43) <sup>a</sup>	6.60 (4.55 – 8.25) <sup>c</sup>	8.75 (6.88 – 13.05) <sup>a,c</sup>	< 0.01

### Datos clínicos pretrasplante

MELD-Na	23 ± 4 <sup>a</sup>	25 ± 5 <sup>c</sup>	29 ± 8 <sup>a,c</sup>	< 0.0001
CLIF-C OF	8 ± 2 <sup>a</sup>	9 ± 2	10 ± 2 <sup>a</sup>	0.01
CLIF-C ACLF	37 ± 9	37 ± 8	41 ± 12	0.18
Bilirrubina total (mg/dL)	4.58 (2.94 – 8.60) <sup>a</sup>	9.75 (5.40 – 16.62)	19.59 (5.48 – 34.11) <sup>a</sup>	< 0.01
INR	1.4 (1.3 – 1.7)	1.6 (1.3 – 2.2)	1.9 (1.4 – 2.6)	0.05
Creatinina (mg/dL)	0.96 (0.75 – 1.29) <sup>a</sup>	0.88 (0.72 – 1.17) <sup>c</sup>	1.23 (0.94 – 1.95) <sup>a,c</sup>	< 0.01
Leucocitos (×10 <sup>9</sup> /L)	4.40 (3.23 – 6.70)	4.80 (2.90 – 6.30)	4.75 (2.48 – 10.45)	0.92

† Incluye hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y síndromes de sobreposición.

‡ Otras etiologías incluyen cirrosis biliar secundaria, daño hepático inducido por fármacos (DILI), y enfermedades hepáticas congénitas.

§ Los datos corresponden a los que se encontraron en el último evento de ACLF (ver Metodología, sección 3.1.2)

Los datos se reportan como n (%), medias (SD) y medianas (IQR). Comparaciones significativas se muestran entre ACLF-1 y ACLF-3 (<sup>a</sup>), ACLF-1 y ACLF-2 (<sup>b</sup>), y ACLF-2 y ACLF-3 (<sup>c</sup>). ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; CLIF-C OF: Chronic Liver Failure Consortium: Organ Failure score; CLIF-C ACLF: Chronic Liver Failure Consortium: Acute-on-Chronic Liver Failure score; INR, International Normalized Ratio; MELD-Na, Model for End-Stage Liver Disease-Sodium; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; VHC, virus de la hepatitis C.

#### 4.1.2 Los pacientes con ACLF tienen una estancia más complicada en el periodo postrasplante, pero una supervivencia comparable a corto y largo plazo

Aunque la gravedad de la enfermedad fue claramente distinta entre pacientes con CC, DC y ACLF, los desenlaces en el periodo postrasplante fueron en su mayoría similares. Mientras que el número total de días en la unidad de terapia intensiva (UTI) fueron comparables, los pacientes con ACLF tuvieron una estancia en piso significativamente más larga (8.0 días [IQR 6.0 – 13.0] vs. 6.0 días [IQR 3.0 – 7.0] y 7.0 días [IQR 4.5 – 10.0], CC y DC, respectivamente;  $p= 0.01$ ). La frecuencia de pacientes que desarrollaron cualquier tipo de complicación (complicaciones Clavien-Dindo I – V (90)) durante su estancia hospitalaria inmediata después del trasplante hepático fue también similar, sin embargo, aquellos con ACLF presentaron con mayor frecuencia complicaciones de tipo infeccioso (47 [49.5%] vs. 1 [9.1%] y 38 [29.5%] CC y DC, respectivamente;  $p < 0.01$ ) (**Tabla 3**). Cuando se compararon los días de estancia hospitalaria y los desenlaces postrasplante entre los diferentes grados de ACLF, no se observaron diferencias significativas, por lo que el curso clínico de aquellos con ACLF-3 después el trasplante fue similar que aquel de los pacientes con ACLF-1 y 2 (**Tabla 4**).

Una evaluación de la mortalidad postrasplante reveló que los pacientes con ACLF, DC y CC tienen una supervivencia comparable al año y a los 6 años después del trasplante (87 [91.6%], 114 [88.4%], 11 [100%] al año, respectivamente;  $p= 0.60$ . 80 [84.2%], 112 [86.8%], y 10 [90.9%] a los 6 años, respectivamente;  $p= 0.90$ ). La mortalidad temprana en los periodos críticos a los 30 días y 3 meses después del trasplante tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.38$  y  $p= 0.30$ , respectivamente).

Todos los grupos recibieron un injerto de la misma calidad al no haberse encontrado diferencias entre los pacientes con respecto al score donator risk index (DRI) ( $p= 0.13$ ) (**Tabla 5A**). La supervivencia evaluada por análisis de Kaplan-Meier fue similar entre los tres estadios de cirrosis ( $p= 0.79$ ; **Figura 8A**). Estos análisis se llevaron a cabo adicionalmente entre los distintos grados de ACLF sin encontrar diferencias significativas con la mortalidad a los 30 días y a los 3 meses ( $p= 0.17$  y  $p= 0.65$ , respectivamente), y la supervivencia al año y 6 años ( $p= 0.40$  y  $p= 0.15$ , respectivamente). De igual manera, no se observaron diferencias con el índice DRI ( $p= 0.08$ ) (**Tabla 5B**). Esto se vio reflejado en un análisis de Kaplan-Meier que no fue significativo ( $p= 0.17$ ; **Figura 8B**), lo que confirma que los desenlaces en el periodo postrasplante son similares, incluso entre pacientes con ACLF grado 3.

**TABLA 3. DESENLACES POSTRASPLANTE (n= 235)**

	<b>Pacientes CC</b> n= 11 (4.5%)	<b>Pacientes DC</b> n= 129 (52.9%)	<b>Pacientes ACLF</b> n= 95 (38.9%)	<b>p</b>
Estancia en UTI (días)	2.0 (1.0 – 4.0)	2.0 (1.5 – 4.0)	3.0 (2.0 – 5.0)	0.05
Estancia en piso (días)	6.0 (3.0 – 7.0) <sup>a</sup>	7.0 (4.5 – 10.0)	8.0 (6.0 – 13.0) <sup>a</sup>	0.01
Cualquier tipo de complicación	7 (63.6%)	105 (81.4%)	85 (89.5%)	0.05
Complicaciones infecciosas	1 (9.1%) <sup>a</sup>	38 (29.5%) <sup>b</sup>	47 (49.5%) <sup>a,b</sup>	< 0.01
<b>Complicaciones (Clavien-Dindo)</b>				
I	4 (36.4%)	17 (13.2%)	19 (20.0%)	0.08
II	2 (18.2%)	51 (39.5%)	32 (33.7%)	0.31
III	1 (9.1%)	14 (10.9%)	17 (17.9%)	0.27
IV	0 (0.0%)	9 (7.0%)	12 (12.6%)	0.23
V	0 (0.0%)	14 (10.9%)	5 (5.3%)	0.24

Los datos se reportan como n (%) y medianas (IQR). Comparaciones significativas se muestran entre CC y ACLF (<sup>a</sup>), DC y ACLF (<sup>b</sup>). Abreviaciones: ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; CC, cirrosis compensada; DC, cirrosis descompensada; UTI, unidad de terapia intensiva.

**TABLA 4. DESENLACES POSTRASPLANTE EN ACLF (n= 95)**

	<b>ACLF-1</b> n= 40 (42.1%)	<b>ACLF-2</b> n= 33 (34.7%)	<b>ACLF-3</b> n= 22 (23.2%)	<b>p</b>
Estancia en UTI (días)	3.0 (2.0 – 4.0)	3.0 (2.0 – 6.0)	3.0 (2.0 – 6.0)	0.68
Estancia en piso (días)	8.0 (5.0 – 11.8)	8.0 (6.0 – 15.5)	6.0 (5.8 – 14.3)	0.54
Cualquier tipo de complicación	35 (87.5%)	31 (93.9%)	19 (86.4%)	0.58
Complicaciones infecciosas	20 (50.0%)	15 (45.5%)	12 (54.5%)	0.80
<b>Complicaciones (Clavien-Dindo)</b>				
I	7 (17.5%)	6 (18.2%)	6 (27.3%)	0.62
II	17 (42.5%)	11 (33.3%)	4 (18.2%)	0.15
III	5 (12.5%)	7 (21.2%)	5 (22.7%)	0.50
IV	4 (10.0%)	6 (18.2%)	2 (9.1%)	0.49
V	2 (5.0%)	1 (3.0%)	2 (9.1%)	0.61

Los datos se reportan como n (%) y medianas (IQR). Abreviaciones: ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; UTI, unidad de terapia intensiva.

**TABLA 5. SUPERVIVENCIA POSTRASPLANTE GENERAL Y POR GRADO DE ACLF**

<b>A)</b>	<b>Pacientes CC</b> n= 11 (4.5%)	<b>Pacientes DC</b> n= 129 (52.9%)	<b>Pacientes ACLF</b> n= 95 (38.9%)	<b>p</b>
<b>DRI</b>	1.41 (1.36 – 2.26)	1.38 (1.21 – 1.53)	1.32 (1.19 – 1.54)	0.13
<b>Mortalidad a los 30 días</b>	0 (0.0%)	10 (7.8%)	3 (3.2%)	0.38
<b>Mortalidad a 3 meses</b>	0 (0.0%)	15 (11.6%)	6 (6.3%)	0.30
<b>Supervivencia al año</b>	11 (100%)	114 (88.4%)	87 (91.6%)	0.60
<b>Supervivencia general †</b>	10 (90.9%)	112 (86.8%)	80 (84.2%)	0.90

† Evaluada hasta el 30 de junio, 2021.

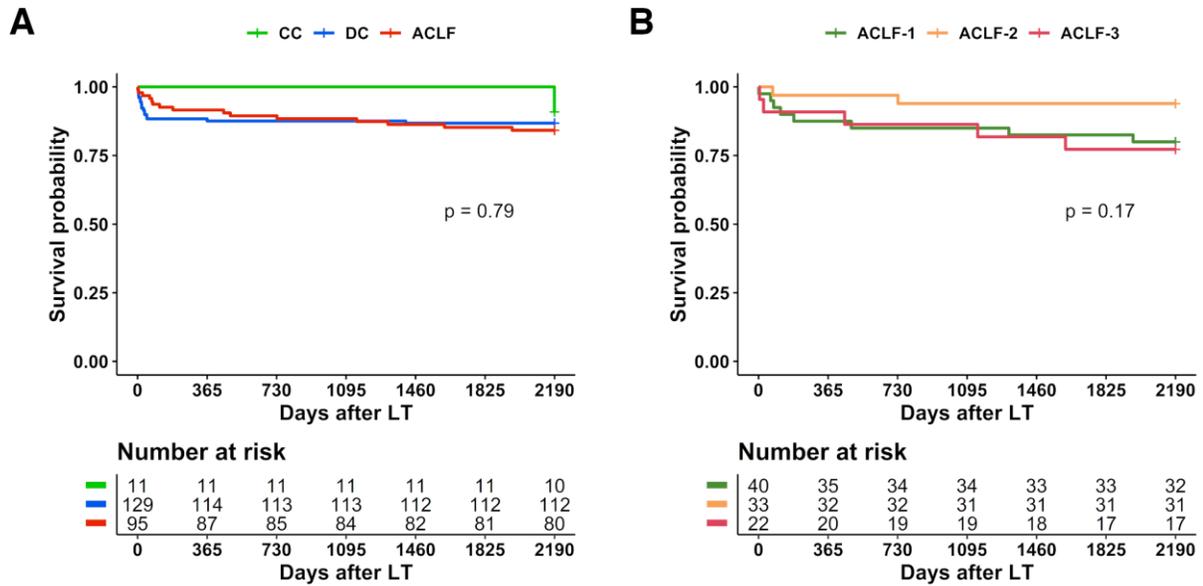
Los datos se reportan como n (%) y medianas (IQR). Abreviaciones: ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; CC, cirrosis compensada; DC, cirrosis descompensada; DRI, Donor Risk Index.

<b>B)</b>	<b>ACLF-1</b> n= 40 (42.1%)	<b>ACLF-2</b> n= 33 (34.7%)	<b>ACLF-3</b> n= 22 (23.2%)	<b>p</b>
<b>DRI</b>	1.43 (1.24 – 1.62)	1.27 (1.20 – 1.43)	1.38 (1.20 – 1.69)	0.08
<b>Mortalidad a los 30 días</b>	1 (2.5%)	0 (0.0%)	2 (9.1%)	0.17
<b>Mortalidad a 3 meses</b>	3 (7.5%)	1 (3.0%)	2 (9.1%)	0.65
<b>Supervivencia al año</b>	35 (87.5%)	32 (97.0%)	20 (90.9%)	0.40
<b>Supervivencia general †</b>	32 (80.0%)	31 (93.9%)	17 (77.3%)	0.15

† Evaluada hasta el 30 de junio, 2021.

Los datos se reportan como n (%) y medianas (IQR). Abreviaciones: ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; DRI, Donor Risk Index.

**FIGURA 8**



**Figura 8. Los pacientes con ACLF presentan una supervivencia posterior al trasplante comparable a corto y largo plazo. Análisis de Kaplan-Meier con datos de supervivencia postrasplante entre cirrosis compensada (CC), cirrosis decompensada (DC), e insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF) (A), y entre grados de ACLF (B).**

#### 4.1.3 DISCUSIÓN. El trasplante hepático es benéfico independientemente del estadio de cirrosis o el grado de insuficiencia hepática aguda sobre crónica

A pesar de las controversias, el trasplante hepático ha sido cada vez más fomentado en pacientes con ACLF, incluyendo aquellos con el mayor grado de esta entidad. Las alteraciones hemodinámicas y la inflamación sistémica pueden detener a los clínicos de considerar un paciente con ACLF como candidato para este procedimiento. Sin embargo, la decisión es tan urgente que la mortalidad en la lista de espera puede ser incluso más alta que la de los pacientes con estatus 1a (91). En apoyo al beneficio del trasplante hepático en pacientes cirróticos críticamente enfermos, este estudio demuestra que de acuerdo con la experiencia unicéntrica del INCMNSZ, los desenlaces en el periodo postrasplante de los pacientes con ACLF son favorables e incluso comparable con aquellos de los pacientes con CC y DC. Asimismo, cuando se realizaron comparaciones entre los distintos grados de ACLF no se observó un peor pronóstico en aquellos con ACLF-3.

En contraste con el estudio CANONIC (27), nuestra población de pacientes fue por lo general más joven y de manera interesante los pacientes con ACLF también fueron los más jóvenes de todos sin haber diferencias al subdividirlos por grado de ACLF. No obstante, la etiología principal en este grupo fue de origen autoinmune. Aunque las enfermedades autoinmunes en cirrosis siguen un curso clínico progresivo y complicado, los pacientes con ACLF autoinmunes en el INCMNSZ mostraron una supervivencia postrasplante similar a la del resto de pacientes sin importar el grado de ACLF, lo que concuerda con un reporte previo (92). La diferencia en la gravedad de la enfermedad entre los pacientes con ACLF y aquellos con CC y DC fue evidente debido a un score MELD-Na y una cuenta de leucocitos significativamente mayor. Estos dos parámetros junto con los scores CLIF-C OF y CLIF-C ACLF disminuyeron al momento del trasplante, indicando una mejoría del síndrome de ACLF y por lo tanto un perfil más favorable que permitió el que se llevara a cabo el trasplante. En efecto, el equipo de Kim y colaboradores habían reportado previamente que tanto un MELD más bajo como la ausencia de progresión de la enfermedad son factores independientes asociados con una alta supervivencia después del trasplante en pacientes con ACLF (93). Asimismo, se observó que el score CLIF-C ACLF al momento del trasplante se volvió similar entre los distintos grados de ACLF, lo que podría explicar aún más la mejoría y por tanto el igualmente excelente desenlace postrasplante entre estos subgrupos.

En comparación con otros estudios (40, 94-96), los pacientes con ACLF-3 en el INCMNSZ se beneficiaron de una mayor tasa de supervivencia al año (90.9%) la cual permaneció elevada aún después de 6 años (77.3%). Existen varios factores de riesgo asociados con una peor mortalidad postrasplante al año en pacientes con ACLF-3, como por ejemplo una edad mayor ( $\geq 53$  años), niveles de lactato arterial pretrasplante elevados, el requerimiento de ventilación mecánica y una cuenta alta de leucocitos ( $\leq 10$  G/L) (97). Contribuyendo al desenlace favorable observado en la población con ACLF del Instituto, incluyendo aquellos con ACLF-3, varios de los factores de riesgo anteriores no se presentaron en estos pacientes. Primero, una edad joven caracterizó a este grupo de pacientes con ACLF y los parámetros clínicos se encontraban

principalmente estables entre todos los grados de ACLF al momento del trasplante. Segundo, la cuenta de leucocitos fue más alta en ACLF que en DC y CC, pero por lo general siempre por debajo de  $10 \times 10^9/L$  tanto durante el evento de ACLF como al momento del trasplante. Mientras que las infecciones bacterianas fueron el precipitante principal de ACLF seguido de factores desconocidos, diferencias importantes con respecto a otras cohortes se pueden encontrar en la frecuencia de ciertas OFs. La insuficiencia respiratoria que es un factor de riesgo asociado con una supervivencia postrasplante más baja (39, 94, 97), fue infrecuente como se observó con las bajas prevalencias de falla pulmonar. En cambio, la falla hepática prevaleció en aquellos con ACLF avanzado, grados 2 y 3, aunque seguido de cerca por OFs extrahepáticas incluyendo la falla renal, la cual fue más frecuente en aquellos con ACLF-1.

Inevitablemente, los pacientes con ACLF tendrán una estancia hospitalaria más larga y complicada después de ser trasplantados como ha sido reportado (40, 96). Esto fue cierto también en el INCMNSZ donde la población con ACLF requirió más días en la unidad de terapia intensiva y en piso. Las complicaciones en el periodo postrasplante de acuerdo con la clasificación de Clavien-Dindo (90), no fueron diferentes entre los pacientes con y sin ACLF en concordancia con una revisión sistemática (96). A pesar de este hallazgo alentador, las complicaciones infecciosas fueron específicamente más comunes en aquellos con ACLF, ocurriendo prácticamente en la mitad de este grupo, lo que también es congruente con el estudio de Artru y colaboradores (40). Ante esta observación se ve justificado un esquema antibiótico más dirigido en pacientes con ACLF y el personal médico debería estar más alerta sobre este desenlace frecuente para promover una mayor supervivencia postrasplante. De manera interesante, las infecciones fueron igualmente prevalentes entre pacientes con ACLF de acuerdo con la experiencia del Instituto, incluso aquellos con ACLF-3, lo que podría deberse al perfil pretrasplante que fue similar entre los diferentes grados de ACLF como se observó por valores similares del score CLIF-C ACLF. Una buena calidad del injerto hepático fue apreciable en todos los pacientes sin importar el estadio de cirrosis, lo que es otro factor que podría haber contribuido a los excelentes desenlaces. No obstante, la calidad del injerto no debería impedir la decisión para llevar a cabo un trasplante hepático en aquellos con ACLF debido a su menor impacto en comparación con el trasplante temprano, como fue reportado recientemente (98).

En conclusión, de 235 trasplantes hepáticos que se realizaron entre el 2015 y 2019 en el INCMNSZ, 38.9% correspondieron a trasplantes realizados en pacientes con ACLF. A pesar de que se encontraron diferencias clínicas importantes con los pacientes sin ACLF (CC y DC) y entre ellos cuando se subdividieron por grado de ACLF, la supervivencia postrasplante fue uniformemente excelente. Una estancia hospitalaria más prolongada y una mayor frecuencia de complicaciones infecciosas se pueden esperar en aquellos con ACLF, sin embargo, esto no debería detener la decisión de trasplantar a este grupo de pacientes. Además, estas observaciones apoyan el beneficio del trasplante incluso en los más críticos (ACLF-3), de acuerdo con las comparables tasas de supervivencia al año y 6 años en el INCMNSZ.

## 4.2 DIFERENCIAS CLÍNICAS EN EL EVENTO INICIAL DE INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA SOBRE CRÓNICA DISTINGUEN A PACIENTES CON MAYOR BENEFICIO DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

### 4.2.1 Características de dos poblaciones distintas de pacientes con ACLF: trasplantados y no trasplantados

Un total de 162 pacientes que cumplieron con criterios de ACLF se incluyeron en este estudio, de los cuales 95 (58.6%) se sometieron a trasplante hepático y 67 (41.4%) no pudieron recibir un trasplante (**Tabla 6**). Este último grupo estuvo compuesto principalmente por pacientes no elegibles al trasplante (n= 54 [80.6%]), cuya mayoría presentó cirrosis avanzada con baja esperanza de vida (n= 23 [42.6%]) o infección activa, no controlada o sepsis (19 [35.8%]). La otra parte de este grupo eran pacientes elegibles al trasplante pero que no sobrevivieron hasta ser trasplantados (n= 13 [19.4%]), siendo las infecciones la causa principal de mortalidad (n= 9 [69.2%]). Aquellos que no fueron elegibles al trasplante presentaron al poco tiempo un desenlace fulminante que se pudo atribuir también principalmente al desarrollo de complicaciones infecciosas (n= 32 [59.3%]; p= 0.75) (**Tabla 7**).

Los pacientes que recibieron un trasplante fueron significativamente más jóvenes que los pacientes no trasplantados (50.0 [IQR 37.0 – 59.0] vs. 57.0 [IQR 47.0 – 65.0], respectivamente; p< 0.001). Las etiologías de origen autoinmune (hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y síndromes de sobreposición) presentaron una alta prevalencia en el Instituto y una proporción significativamente mayor se observó en aquellos que fueron sometidos a trasplante hepático (44.2% vs. 26.9%, p= 0.02). Notablemente, la gravedad de la enfermedad fue similar entre las dos poblaciones de pacientes con ACLF cuando se evaluó con el MELD-Na en el evento inicial (30 ± 6 y 29 ± 5, pacientes no trasplantados y trasplantados respectivamente, p= 0.17). Sin embargo, después de evaluar los scores CLIF-OF y CLIF-C ACLF los pacientes que no fueron trasplantados mostraron tener la mayor gravedad (11 ± 2 vs. 10 ± 2, p< 0.01, y 51 ± 9 vs. 44 ± 9, p< 0.0001, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a los precipitantes del evento inicial de ACLF y tanto en los pacientes trasplantados como en los no trasplantados las infecciones bacterianas fueron el precipitante más común (55.2% y 47.4%, respectivamente) seguido de precipitantes no identificables (25.4% y 34.7%, respectivamente).

**TABLA 6. DEMOGRAFÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS:  
PACIENTES CON ACLF TRASPLANTADOS Y NO TRASPLANTADOS (n= 162)**

	<b>No trasplantados</b> n= 67 (41.4%)	<b>Trasplantados</b> n= 95 (58.6%)	<b>p</b>
Sexo masculino, n (%)	33 (49.3%)	47 (49.5%)	0.99
Edad, años	57.0 (47.0 – 65.0)	50.0 (37.0 – 59.0)	< 0.01
Estatura, m	1.64 ± 0.10	1.64 ± 0.10	0.67
Peso, kg	65.21 ± 13.36	68.45 ± 14.40	0.15
IMC	24.29 ± 3.98	25.23 ± 4.15	0.15
Diabetes tipo 2	15 (22.4%)	13 (13.7%)	0.15
Hipertensión arterial	12 (17.9%)	6 (6.3%)	0.02
<b>Etiología de la cirrosis, n (%)</b>			
Autoinmune †	18 (26.9%)	42 (44.2%)	0.02
VHC	11 (16.4%)	13 (13.7%)	0.63
Enfermedad hepática alcohólica	13 (19.4%)	9 (9.5%)	0.07
NASH	5 (7.5%)	6 (6.3%)	0.78
Criptogénica	16 (23.9%)	18 (18.9%)	0.45
Otras ‡	4 (6.0%)	7 (7.4%)	0.99
<b>MELD-Na</b>	30 ± 6	29 ± 5	0.17
<b>CLIF-C OF</b>	11 ± 2	10 ± 2	< 0.01
<b>CLIF-C ACLF</b>	51 ± 9	44 ± 9	< 0.0001
<b>Precipitante del evento inicial de ACLF</b>			
Infecciones bacterianas	37 (55.2%)	45 (47.4%)	0.33
Hemorragia gastrointestinal	8 (11.9%)	7 (7.4%)	0.32
Alcoholismo activo	1 (1.5%)	0 (0.0%)	0.41
Otro	6 (9.0%)	10 (10.5%)	0.74
Desconocido	17 (25.4%)	33 (34.7%)	0.20
<b>Pacientes con múltiples eventos de ACLF</b>	36 (53.7%)	53 (55.8%)	0.80

† Incluye hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y síndromes de sobreposición.

‡ Otras etiologías incluyen cirrosis biliar secundaria, daño hepático inducido por fármacos (DILI), y enfermedades hepáticas congénitas.

Los datos se reportan como n (%), medias (SD) y medianas (IQR). ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; CLIF-C, Chronic Liver Failure Consortium; ICU, terapia intensiva; LT, trasplante hepático; MELD-Na, Model for End-Stage Liver Disease-Sodium; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; OF, falla orgánica; VHC, virus de la hepatitis C.

**TABLA 7. PACIENTES CON ACLF NO TRASPLANTADOS:  
CAUSAS DE EXCLUSIÓN Y MORTALIDAD**

	<b>No elegibles al trasplante</b> n= 54 (80.6%)	<b>Elegibles al trasplante</b> n= 13 (19.4%)	<b>p</b>
Sexo masculino, n (%)	25 (46.3%)	7 (53.8%)	0.63
Edad, años	58.0 (47.8 – 65.0)	48.0 (36 – 61.5)	0.06
Infección activa, no controlada o sepsis	19 (35.8%)	9 (69.2%)	-
Cirrosis avanzada con baja esperanza de vida	23 (42.6%)	-	-
Alcoholismo activo o abuso de sustancias	10 (18.5%)	-	-
Trombosis portal difusa	8 (14.8%)	-	-
Enfermedad cardiopulmonar avanzada	6 (11.1%)	-	-
Problemas psicosociales	6 (11.1%)	-	-
Edad avanzada (≥ 70 años)	3 (5.6%)	-	-
Trasplante rechazado por el paciente	3 (5.6%)	-	-
Malnutrición / Fragilidad	2 (3.7%)	-	-
HCC fuera de los criterios de Milán	1 (1.9%)	-	-
<b>Causas de mortalidad</b>			
Infecciones	32 (59.3%)	9 (69.2%)	0.75
Hemorragia gastrointestinal	5 (9.3%)	1 (7.7%)	0.99
Fallecieron en casa	12 (22.2%)	2 (15.4%)	0.72
Otros	5 (9.3%)	1 (7.7%)	0.99

Los datos se reportan como n (%) y medianas (IQR). ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; HCC, carcinoma hepatocelular.

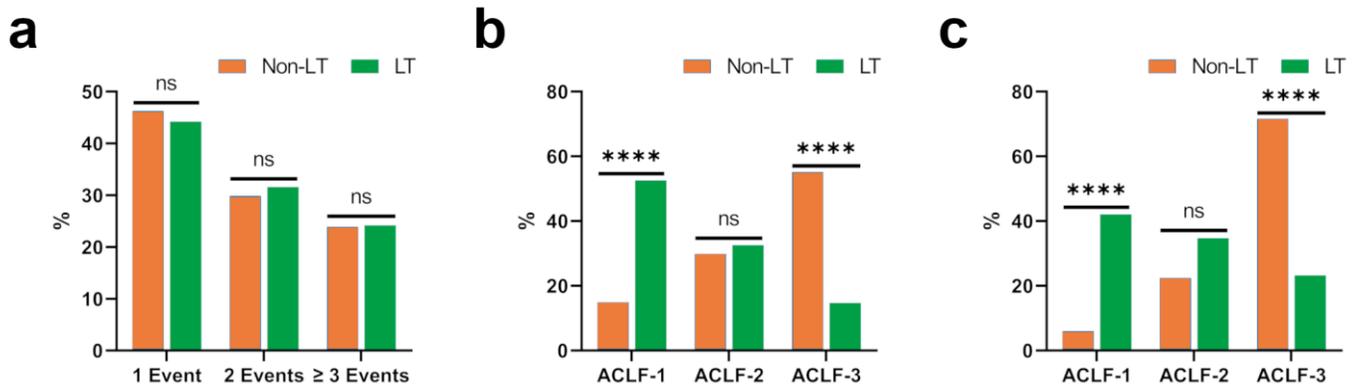
#### 4.2.2 Durante su curso clínico, los pacientes con ACLF pueden desarrollar múltiples eventos de ACLF y con diferente gravedad de la enfermedad

La revisión de los expedientes clínicos y datos de laboratorio desde el primer registro en el Instituto hasta el fallecimiento o trasplante reveló que los pacientes con ACLF presentaron uno o múltiples eventos que cumplen con criterios para esta entidad y que pueden variar en cuanto al grado de ACLF. Los pacientes en ambos grupos desarrollaron múltiples eventos de ACLF con frecuencias similares (53.7% vs. 55.8%, respectivamente,  $p= 0.80$ ; **Tabla 6**) y no se encontraron diferencias entre aquellos que presentaron un evento único de ACLF (46.3% vs. 44.2%,  $p= 0.80$ ), 2 eventos (29.9% vs. 31.6%,  $p= 0.82$ ) y 3 o más eventos (23.9% vs. 24.2%;  $p= 0.96$ ) (**Figura 9a**).

Sin embargo, las diferencias principales entre ambos grupos radicarón en la gravedad de la enfermedad durante el evento inicial de ACLF. Mientras que la mayoría de los pacientes que se sometieron a trasplante hepático iniciaron como ACLF-1 (52.6% vs. 14.9%,  $p< 0.0001$ ), aquellos que no recibieron un trasplante presentaron de manera más frecuente ACLF-3 (55.2% vs. 14.7%,  $p< 0.0001$ ) (**Figura 9b**). Se observó un patrón similar cuando se evaluó el grado de ACLF en el último evento, donde un porcentaje muy alto de pacientes que no sobrevivieron hasta ser trasplantados tuvieron ACLF-3 (71.6%) comparado con los pacientes trasplantados los cuales tuvieron una alta prevalencia de ACLF-1 (42.1%) (**Figura 9c**). Un incremento significativo de ACLF-3 entre el evento inicial y el último fue evidente tanto en los pacientes no trasplantados como en aquellos trasplantados ( $p= 0.03$  y  $p= 0.04$ , respectivamente) y adicionalmente, una disminución significativa de la frecuencia de ACLF-1 ocurrió en estos últimos ( $p= 0.04$ ) (**Figura 9b-c**).

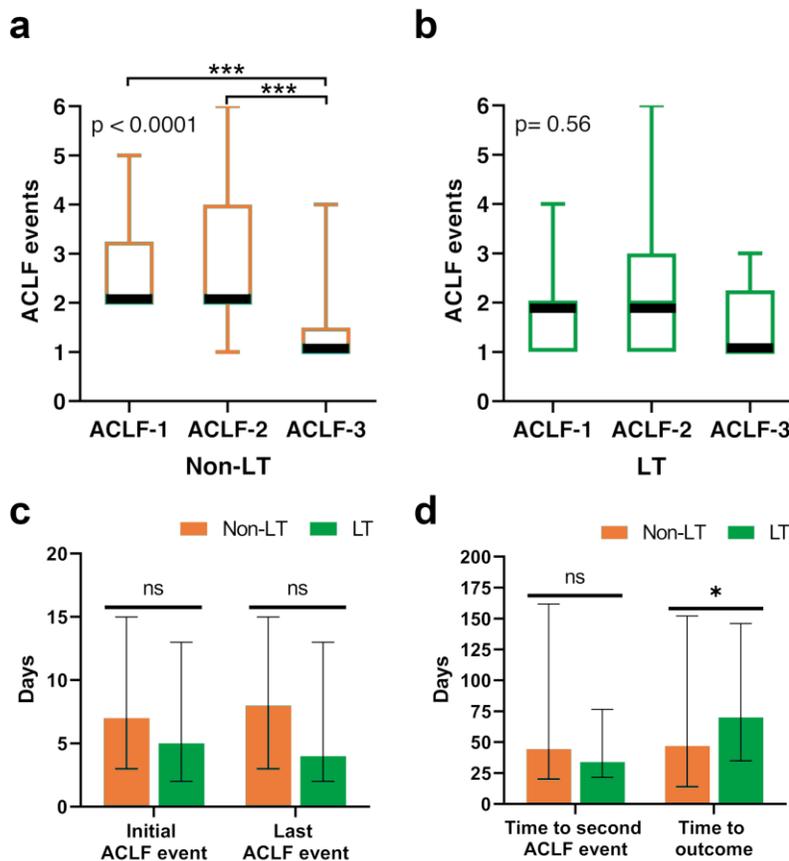
Dentro del grupo de los pacientes no trasplantados fue evidente que aquellos con ACLF-3 desarrollaron menos eventos de ACLF, lo que señala a la gravedad de la enfermedad que presentaban y a una de las razones por las que no pudieron sobrevivir hasta un posible trasplante hepático (**Figura 10a**). No obstante, esta diferencia no se observó dentro de los pacientes trasplantados y el número de eventos de ACLF fue similar cuando se subdividieron por el grado de ACLF presente en el evento inicial (**Figura 10b**). La duración de los eventos inicial y último fue similar entre los pacientes trasplantados y no trasplantados, con una mediana para el evento inicial de 7.0 días (IQR 3.0 – 15.0) y 5.0 días (IQR 2.0 – 13.0), respectivamente ( $p= 0.14$ ), y una mediana para el último evento de 8.0 días (IQR 3.0 – 15.0) y 4.0 días (IQR 2.0 – 13.0), respectivamente ( $p= 0.16$ ) (**Figura 10c**). El tiempo que tomó a desarrollar un segundo evento de ACLF también fue similar entre los dos grupos, siendo de 34.0 días (IQR 21.5 – 76.5) en los pacientes trasplantados y de 44.5 días (IQR 20.3 – 161.8) en aquellos que no recibieron trasplante ( $p= 0.34$ ) (**Figura 10d**). Sin embargo, estos últimos llegaron a su desenlace (fallecimiento) significativamente más rápido que los pacientes trasplantados (47.0 días [IQR 14.0 – 152.0] vs. 70.0 días [IQR 35.0 – 146.0], respectivamente;  $p= 0.04$ ) (**Figura 10d**), reiterando así su mayor gravedad.

**FIGURA 9**



**Figura 9. Los pacientes con ACLF presentan un curso clínico dinámico.** Número de eventos de ACLF entre pacientes no trasplantados (Non-LT) y trasplantados (LT) (a) y prevalencia de los grados de ACLF entre estos grupos en los eventos de ACLF inicial (b) y último (c). Las comparaciones se realizaron con la prueba de  $\chi^2$ . \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ns, no significativo. Abreviaciones: ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; LT, trasplante hepático.

**FIGURA 10**



**Figura 10. Número de eventos de ACLF de acuerdo con el grado de ACLF inicial (a), duración de los eventos de ACLF inicial y último (b) y tiempo al desarrollo de un segundo evento de ACLF o al desenlace (c).** Los datos se presentan en a y b como diagramas de cajas y bigotes, donde la línea gruesa dentro de cada caja representa la mediana, los límites de las cajas indican las percentilas 25 y 75, y los bigotes los valores mínimo y máximo. Las comparaciones múltiples de cada diagrama se realizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones en b y c con la prueba U de Mann-Whitney; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ns, no significativo. Abreviaciones: ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; LT, trasplante hepático.

#### 4.2.3 Los pacientes con ACLF que sobreviven o no hasta ser trasplantados desarrollan diferentes tipos de fallas orgánicas antes de su desenlace

Para determinar si ambos grupos diferían también en cuanto al tipo de fallas orgánicas (OFs) que desarrollaron, se analizaron los eventos de ACLF inicial y último. Los pacientes que no pudieron recibir un trasplante hepático desarrollaron OFs predominantemente extrahepáticas tanto en el evento inicial como en el último evento de ACLF en comparación con los pacientes que sí fueron trasplantados. En específico, varios de los pacientes no trasplantados presentaron las OFs renal (71.6% vs. 41.1%,  $p < 0.001$ ), circulatoria (70.1% vs. 27.4%,  $p < 0.0001$ ), cerebral (49.3% vs. 14.7%,  $p < 0.0001$ ), y pulmonar (25.4% vs. 9.5%,  $p = 0.01$ ) (**Figura 11a-b**). En contraste, en el grupo de aquellos que sí fueron trasplantados la OF hepática fue la más prevalente en el evento inicial y en el último evento de ACLF (49.5% y 54.7%, respectivamente). Comparaciones dentro de cada grupo revelaron que la prevalencia de las OFs de coagulación y pulmonar incrementó significativamente desde el evento inicial al último en los pacientes no trasplantados ( $p = 0.04$  y  $p = 0.02$ , respectivamente), mientras que un incremento significativo de la OF cerebral ocurrió en aquellos que recibieron un trasplante ( $p = 0.01$ ) (**Figura 11a-b**).

Adicionalmente, se analizaron las combinaciones más frecuentes de las diferentes OFs que los dos grupos manifestaron en los eventos de ACLF inicial y último. Considerando solo aquellas que coincidieron en por lo menos dos pacientes, los pacientes que no pudieron ser trasplantados presentaron predominantemente combinaciones que implicaban la OF renal con una o más OFs diferentes (**Figura 11c**). Como se puede observar en este grupo, la presencia de dos o tres OFs fue frecuente tanto en el evento de ACLF inicial como en el último (**Figura 11c-d**). Algunos pacientes manifestaron una combinación de cinco o seis OFs, siendo la más frecuente aquella con las OFs pulmonar, renal, cerebral, de la coagulación y circulación (8.96%). Esto refleja la gravedad y la complejidad del curso clínico del grupo de pacientes que no pudo recibir un trasplante hepático. Por el contrario, en aquellos que sí fueron trasplantados la OF renal aislada fue una manifestación común de los eventos de ACLF inicial y último (14.74%) mientras que las combinaciones que involucraron más de 2 OFs fueron infrecuentes (**Figura 11c-d**).

FIGURA 11

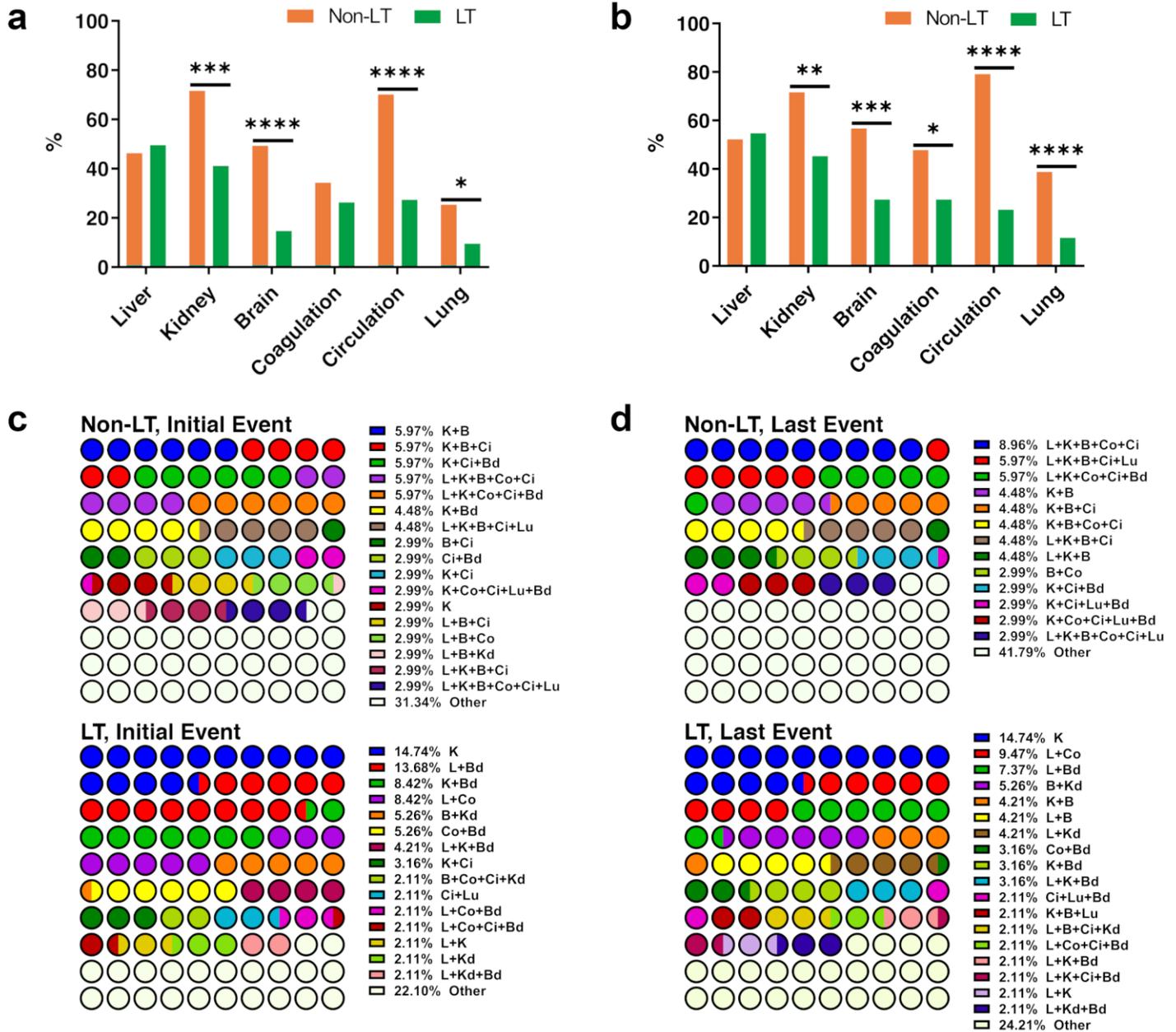


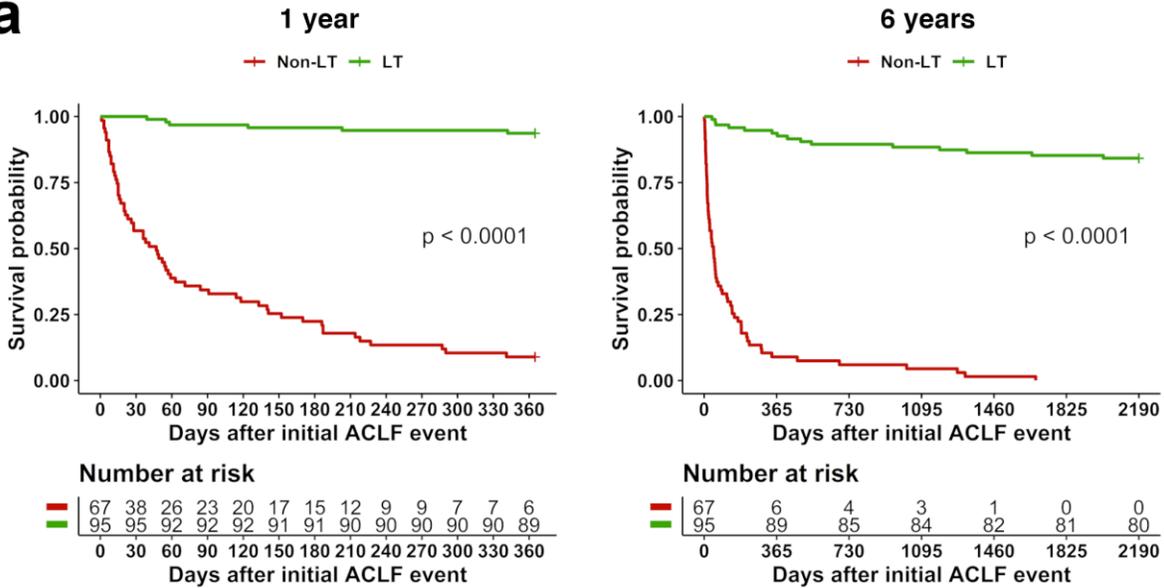
Figura 11. Prevalencia de las fallas orgánicas y sus combinaciones en los eventos de ACLF inicial y último. Las comparaciones entre pacientes no trasplantados (Non-LT) y trasplantados (LT) con respecto a la prevalencia de las OFs en los eventos de ACLF inicial (a) y último (b) se analizaron con la prueba de  $\chi^2$ . Las frecuencias de las combinaciones de OFs en c y d son representadas con diagramas de 10x10 puntos. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001. Abreviaciones: ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; LT, trasplante hepático; B, cerebral; Bd, disfunción cerebral; Ci, circulación; Co; coagulación; K, renal; Kd, disfunción renal; L, hepática; Lu, pulmonar.

#### 4.2.4 Diferencias en la mortalidad posterior al primer evento de ACLF distinguen adicionalmente a los pacientes con ACLF que se benefician del trasplante hepático

Las curvas de Kaplan-Meier mostraron que los pacientes que no pudieron recibir un trasplante hepático tuvieron una supervivencia marcadamente reducida después de presentar ACLF como se observó al año y a los 6 años ( $p < 0.0001$  cada uno) (**Figura 12a**). Las diferencias de mortalidad entre ambos grupos fueron muy notables aún desde los 30 días, encontrando una mortalidad de 0% en los pacientes que recibieron un trasplante y de 43.3% en aquellos que no pudieron ser trasplantados ( $p < 0.0001$ ; **Tabla 8**). La mortalidad a los 3 y 6 meses fue de 65.7% y 77.6% en estos últimos y de 3.2% y 4.2% en los que fueron trasplantados ( $p < 0.0001$ ; **Tabla 8**). Los subanálisis de supervivencia de acuerdo con el grado de ACLF tanto en el evento inicial como en el último no fueron significativos en los pacientes trasplantados ( $p = 0.68$  y  $p = 0.60$ , respectivamente; **Figura 12b**). Por el contrario, los pacientes que no recibieron un trasplante y que en el evento inicial presentaron tanto ACLF-1 como ACLF-2 tuvieron una supervivencia significativamente mayor comparada con la de aquellos con ACLF-3 ( $p = 0.001$  cada uno) mientras que en el último evento de ACLF los pacientes con ACLF-2 tuvieron una mayor supervivencia que aquellos con ACLF-3 ( $p = 0.01$ ). La mortalidad de acuerdo con el grado de ACLF fue distinta entre los dos grupos. Los pacientes con ACLF-3 y que no pudieron recibir un trasplante tuvieron la más alta mortalidad cuando se evaluaron considerando los eventos de ACLF inicial y último. A los 6 meses el 94.6% de los pacientes en este grupo habían sucumbido a la ACLF (**Tabla 8**). En contraste, a los 6 meses la mortalidad en los pacientes trasplantados fue menor de 10% sin importar el grado de ACLF. Los datos de mortalidad se reportan más detalladamente en la **Tabla 8**.

FIGURA 12

**a**



**b**

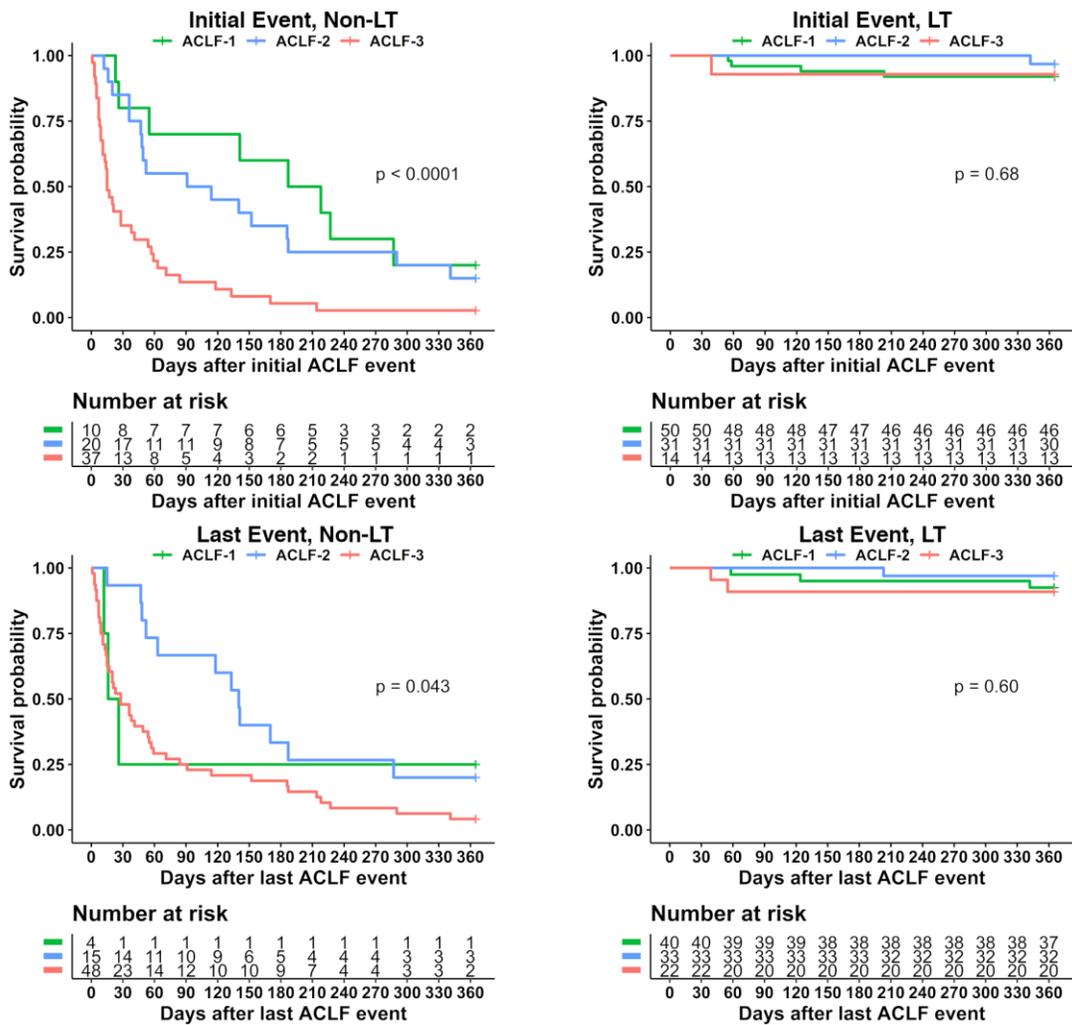


Figura 12. Análisis de supervivencia entre pacientes no trasplantados y trasplantados (a) y de acuerdo con los grados de ACLF en los eventos de ACLF inicial y último (b) Las curvas de Kaplan-Meier se compararon con la prueba de log-rank. Abreviaciones: ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; LT, trasplante hepático

**TABLA 8. MORTALIDAD ENTRE COHORTES Y POR GRADO DE ACLF**

	<b>No trasplantados</b> n= 67	<b>Trasplantados</b> n= 95	<b>p</b>
30 días	29 (43.3%)	0 (0.0%)	< 0.0001
3 meses	44 (65.7%)	3 (3.2%)	< 0.0001
6 meses	52 (77.6%)	4 (4.2%)	< 0.0001
1 año	61 (91.0%)	6 (6.3%)	< 0.0001
6 años	67 (100.0%)	15 (15.8%)	< 0.0001

**GRADO DE ACLF EN EL EVENTO INICIAL**

	<b>ACLF-1</b> n= 10 (14.9%)	<b>ACLF-2</b> n= 20 (29.9%)	<b>ACLF-3</b> n= 37 (55.2%)	<b>p</b>
<b>No trasplantados</b>				
30 días	2 (20.0%) <sup>a</sup>	3 (15.0%) <sup>b</sup>	24 (64.9%) <sup>a, b</sup>	< 0.001
3 meses	3 (30.0%) <sup>a</sup>	9 (45.0%) <sup>b</sup>	32 (86.5%) <sup>a, b</sup>	< 0.001
6 meses	4 (40.0%) <sup>a</sup>	13 (65.0%) <sup>b</sup>	35 (94.6%) <sup>a, b</sup>	< 0.001
1 año	8 (80.0%)	17 (85.0%)	36 (97.3%)	0.09
6 años	10 (100.0%)	20 (100.0%)	37 (100.0%)	0.99
<b>Trasplantados</b>	<b>ACLF-1</b> n= 50 (52.6%)	<b>ACLF-2</b> n= 31 (32.6%)	<b>ACLF-3</b> n= 14 (14.7%)	<b>p</b>
30 días	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
3 meses	2 (4.0%)	0 (0.0%)	1 (7.1%)	0.26
6 meses	3 (6.0%)	0 (0.0%)	1 (7.1%)	0.36
1 año	4 (8.0%)	1 (3.2%)	1 (7.1%)	0.73
6 años	9 (18.0%)	3 (9.7%)	3 (21.4%)	0.47

**GRADO DE ACLF EN EL ÚLTIMO EVENTO**

	<b>ACLF-1</b> n= 4 (6.0%)	<b>ACLF-2</b> n= 15 (22.4%)	<b>ACLF-3</b> n= 48 (71.8%)	<b>p</b>
<b>No trasplantados</b>				
30 días	3 (75.0%) <sup>a, c</sup>	1 (6.7%) <sup>c, d</sup>	25 (52.1%) <sup>d</sup>	< 0.01
3 meses	3 (75.0%)	5 (33.3%) <sup>d</sup>	36 (75.0%) <sup>d</sup>	0.01
6 meses	3 (75.0%)	10 (66.7%)	39 (81.3%)	0.45
1 año	3 (75.0%)	12 (80.0%)	46 (95.8%)	0.08
6 años	4 (100.0%)	15 (100.0%)	48 (100.0%)	0.99
<b>Trasplantados</b>	<b>ACLF-1</b> n= 40 (42.1%)	<b>ACLF-2</b> n= 33 (34.7%)	<b>ACLF-3</b> n= 22 (23.2%)	<b>p</b>
30 días	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
3 meses	1 (2.5%)	0 (0.0%)	2 (9.1%)	0.17
6 meses	2 (5.0%)	0 (0.0%)	2 (9.1%)	0.21
1 año	3 (7.5%)	1 (3.0%)	2 (9.1%)	0.65
6 años	8 (20.0%)	2 (6.1%)	5 (22.7%)	0.15

#### 4.2.5 **DISCUSIÓN.** Diferencias en el evento inicial de insuficiencia hepática aguda sobre crónica distinguen a pacientes con mayor beneficio del trasplante hepático

ACLF es una entidad distinta dentro del espectro de cirrosis, como se observa por su alta mortalidad a corto y largo plazo y su complejo curso clínico. Con la evidencia de este estudio observacional, se demostró mediante una comparación novedosa entre pacientes con ACLF que recibieron o no un trasplante hepático que esta entidad puede variar considerablemente de paciente a paciente y que características de su único o múltiples eventos de ACLF pueden determinar su pronóstico. Las observaciones que se presentan aquí fueron posibles dada una revisión completa de los expedientes clínicos y datos de laboratorio de los pacientes desde su evento inicial de ACLF hasta su desenlace, permitiendo así un análisis que no es restringido a un cierto número de días de observación a diferencia de los demás estudios sobre ACLF que en su mayoría se han limitado a observaciones de 28 días.

Considerando las características clínicas y demográficas de la población con ACLF que logra o no recibir un trasplante en el Instituto, ciertos aspectos podrían ayudar a distinguir más fácilmente aquellos pacientes que tendrían mayor beneficio del procedimiento. Es imperativo reconocer desde temprano aquellos cuyo curso clínico indica un bajo riesgo de mortalidad con el fin de asignar recursos a los pacientes que los podrían aprovechar más, evitando así un posible trasplante fútil. Los pacientes que pudieron recibir un trasplante hepático fueron más jóvenes y aunque en ambas cohortes las etiologías autoinmunes fueron la causa más frecuente de cirrosis, la frecuencia de hepatitis alcohólica tendió a ser mayor en aquellos que no fueron trasplantados. El alcoholismo activo fue, de hecho, la tercera razón principal por la que un paciente con ACLF no fue considerado como candidato al procedimiento en el Instituto, aunque lo superó por mucho el tener cirrosis avanzada con baja esperanza de vida y sobre todo la presencia de infecciones no controladas o sepsis. En concordancia, el precipitante principal de ACLF en estos pacientes fueron las infecciones bacterianas a las cuales se encuentran predispuestos, por lo tanto el alcoholismo es un factor relevante de mal pronóstico dado el riesgo incrementado que conlleva para el desarrollo de ACLF, como se ha demostrado en cohortes tanto europeas como asiáticas (27, 99, 100), y este estudio resalta adicionalmente la desventaja que impone en la lista de espera para trasplante hepático. De manera sorprendente, el score MELD-Na no fue significativamente diferente entre aquellos que se sometieron o no al procedimiento, sin embargo, una diferencia importante en la gravedad de la enfermedad fue evidente después de evaluar los scores CLIF-OF y CLIF-C ACLF los cuales estuvieron más altos en los pacientes que no fueron trasplantados. Esto confirma la utilidad de un score de pronóstico específico para pacientes con ACLF, siendo estos últimos más precisos con una mejoría reportada de aproximadamente 20 a 25% en la predicción de la mortalidad a 28 y 90 días (37). También va de la mano con el estudio de Hernaez et al. en el que se demostró que después de evaluar la mortalidad observada vs. la esperada usando el MELD-Na, la tasa de mortalidad estandarizada en pacientes con ACLF fue de 1.5, todo lo cual los coloca en desventaja de recibir un trasplante (101). No obstante, al considerar un score CLIF-C ACLF promedio de 51 en la cohorte ICU la mortalidad esperada a los 3, 6 meses y al año fue considerablemente más baja que la observada (49%, 54% y 62% esperada vs. 66%, 79% y

92% observada), por lo tanto, cierta subestimación puede ser relevante a tomar en consideración y se deberá hacer un esfuerzo para mejorar dichos scores con el fin de otorgar mayor equidad a los pacientes en lista de espera.

Otro aspecto que distintivamente identificó a los pacientes en cada grupo y por tanto determinó la viabilidad del trasplante fue la frecuencia de ciertas OFs y sus combinaciones en los eventos de ACLF inicial y último. Una diferencia muy evidente fue que las OFs extrahepáticas fueron más comunes en los pacientes que no fueron trasplantados, siendo la OF renal la más frecuente seguida de cerca por la OF de la circulación. Por el contrario, la OF hepática fue más común en los pacientes con ACLF que sí recibieron trasplante. Dos hipótesis podrían explicar dichos hallazgos. La primera es que los pacientes con OFs extrahepáticas y un grado de ACLF mayor podrían haber sido considerados demasiado enfermos como para ser trasplantados de manera que no recibieron prioridad para recibir un injerto. Una segunda explicación es que el score MELD-Na resultó ser insuficientemente preciso para predecir la mortalidad en estos pacientes, lo que resaltaría la relevancia de valorar la gravedad de la enfermedad con scores específicamente diseñados para ACLF. Su implementación generalizada y mejoría serán cruciales para mejorar los desenlaces de aquellos pacientes cirróticos que progresan hasta este extremo de la enfermedad.

Cualquiera de estos dos factores podrían ciertamente haber retrasado la decisión de trasplantar a dichos pacientes y especialmente ante la presencia de factores que contraindican el trasplante hepático o complicaciones como son las infecciones, que en este estudio y otros (39, 102) son una razón principal del fallecimiento o la exclusión de la lista de espera. La rápida progresión de la ACLF que se observó en los pacientes que no pudieron recibir un trasplante junto con la falta inmediata de injertos hepáticos son limitaciones importantes que obstaculizan la ejecución de este procedimiento. No obstante, esto subraya adicionalmente la relevancia de detectar tempranamente aquellos cuyo curso clínico es compatible con los criterios de ACLF para acelerar su valoración como candidatos potenciales a un trasplante hepático.

Una característica adicional de este estudio fue la determinación del desarrollo y número de eventos múltiples de ACLF, un aspecto que no ha sido completamente explorado en la literatura actual. De manera interesante, más de la mitad de los pacientes en cada grupo presentaron durante su curso clínico más de un evento que cumplía con criterios de ACLF y el acontecimiento de 2, 3 o más eventos fue también similar. De esta manera, el desarrollar múltiples eventos de descompensación no necesariamente debe indicar mayor gravedad de la enfermedad; de hecho, los pacientes que no fueron trasplantados presentaron con mayor frecuencia un solo evento, pero desafortunadamente de mayor gravedad (ACLF-3) después del cual fallecieron. Debido a que el último evento en los pacientes trasplantados no siempre ocurrió en el momento del trasplante, un factor importante que determinará su elegibilidad para este procedimiento es su capacidad para sobrevivir un evento de ACLF. Sin embargo, un retraso en la asignación de un injerto hepático podría predisponer a los pacientes a desarrollar OFs adicionales como se demostró en un estudio donde el desarrollo de ACLF-1 fue un factor de riesgo importante para la progresión a ACLF-3 (103). En consecuencia, en ambos grupos se

observó un incremento significativo en la prevalencia de ACLF-3 en el último evento, así como una disminución en aquella de ACLF-1 en los pacientes que recibieron un trasplante.

Resaltando la relevancia de una revisión completa y exhaustiva del curso clínico de pacientes con ACLF, estos hallazgos contrastan con las elevadas frecuencias de resolución del síndrome (42.5% y 54.1%) reportadas en estudios que analizaron solo los primeros 28 días después del diagnóstico (38, 104). Debido a que tanto en los pacientes trasplantados como en los no trasplantados un evento de ACLF tuvo una duración mediana de aproximadamente una semana y el tiempo a un segundo evento de ACLF en ambos grupos ocurrió después de 28 días, sí puede ser posible que los pacientes analizados en aquellos estudios dejaron de cumplir criterios de ACLF, pero también es posible que hayan regresado a ACLF después de un tiempo. Por otro lado, estas observaciones podrían apoyar la estrategia propuesta de reevaluar a los pacientes con ACLF después de 3 a 7 días de ser diagnosticados para determinar su grado final de ACLF y con esto su elegibilidad para el trasplante, dado que este periodo coincide con el fin de un evento de ACLF. Este periodo de tiempo entre el séptimo y trigésimo día podría entonces ser crítico para enlistar y eventualmente trasplantar a dichos pacientes ya que podrían estar en riesgo de desarrollar un segundo evento con grado de ACLF aún mayor, lo que obstaculizaría sus posibilidades de ser sometidos a este procedimiento. Varios estudios enfatizan la urgencia del trasplante en pacientes con ACLF, reportando un excelente pronóstico tras el procedimiento, con tasas de supervivencia al año comparables entre pacientes con y sin ACLF, así como la ausencia de diferencias en cuanto al desarrollo de enfermedad renal crónica y disfunción temprana del injerto (105-107). Con este proyecto de doctorado los datos analizados del centro de trasplantes del INCMNSZ apoyan el beneficio del trasplante en ACLF al año y a los 6 años, incluyendo aquellos con ACLF-3 (108), lo cual enfatizo también en este estudio (**Figura 12**).

Reflejando la amplia diferencia entre los posibles cursos clínicos de pacientes con ACLF, las curvas de Kaplan Meier demostraron por un lado el drástico pronóstico esperado cuando las características del paciente favorecen o no el trasplante hepático y por el otro, la rapidez con la que los pacientes que son excluidos de la lista de espera o fallecen en la misma alcanzan un desenlace fatal. Mientras que la mortalidad en los pacientes trasplantados fue estable en cada punto en el tiempo analizado, los pacientes que no recibieron un trasplante experimentaron tasas de mortalidad muy altas aún a partir de los 30 días (43.3%) y solo 6 pacientes (9.0%) estuvieron vivos después de 1 año. En concordancia, el estudio de Finkenstedt et al. (39) reportó una mediana de supervivencia libre de trasplante de 48 días la cual es casi idéntica a la de este estudio (47 días [14.0 – 152.0]). Como se conocía previamente, los pacientes con ACLF-3 tuvieron el peor pronóstico, sin embargo, en específico solo aquellos que fueron excluidos de la lista de espera y especialmente cuando se evaluó el evento de ACLF inicial. Las diferencias de mortalidad entre los grados de ACLF en el último evento pudieron haber sido menos notorias dado el empeoramiento generalizado al observarse un incremento significativo en la prevalencia de ACLF-3. Esto podría enfatizar la relevancia de estudiar el curso clínico completo de los pacientes con ACLF para determinar su estado de descompensación de manera más precisa. De manera interesante, las tasas de mortalidad fueron similares entre los grados de ACLF en los pacientes que sí fueron trasplantados, lo que confirma el excelente y

comparable pronóstico que se puede esperar de los pacientes con ACLF-3 tras el procedimiento como ha sido descrito también por otros autores (40).

En resumen, este estudio describe y compara el curso clínico de dos grupos diferentes de pacientes con ACLF que de acuerdo con la gravedad de la enfermedad pudieron o no ser sometidos a este procedimiento. Las observaciones aquí descritas llevan a la identificación de determinantes potenciales de bajo riesgo de mortalidad que pudieran indicar qué pacientes con ACLF se podrían beneficiar más de un trasplante hepático. Después de un análisis exhaustivo de los expedientes clínicos y datos de laboratorio de estos pacientes, se demuestra que el desarrollo de múltiples eventos de ACLF es una característica común que podría estar asociada con la progresión del curso de la enfermedad. Un score CLIF-OF y CLIF-C ACLF más alto y el desarrollo de ciertas OFs en el evento inicial de ACLF podrían distinguir a pacientes que no son elegibles para recibir un trasplante. Aquellos con un perfil más favorable y que han sobrevivido un evento de ACLF podrían tener mayor provecho de todos los recursos que implica un trasplante, mostrando una mortalidad notoriamente reducida a corto y largo plazo.

### 4.3 LA GALECTINA-3 SE ENCUENTRA SOBRE-EXPRESADA EN PACIENTES CON CIRROSIS AVANZADA Y PREDICE COMPLICACIONES INFECCIOSAS POSTERIORES AL TRASPLANTE HEPÁTICO

#### 4.3.1 Características demográficas de los pacientes analizados

Para determinar la relevancia de la galectina-3 como parámetro clínico, se analizaron un total de 129 pacientes, todos los cuales recibieron trasplante hepático ortotópico en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Esta población se compone de 9 pacientes con CC, 59 con CD, y 61 con ACLF los cuales se compararon contra controles sanos cuya mediana de edad es similar (n= 10) o contra las muestras de hígado de donadores cadavéricos (n= 35). Las características de esta población se muestran en la **Tabla 9**.

Estos datos muestran que los parámetros de laboratorio y clínicos varían significativamente entre cada estadio de cirrosis, incluyendo los niveles de bilirrubina total, el INR y el desarrollo de ascitis y encefalopatía (todos  $p < 0.0001$ ). La creatinina fue más alta en los pacientes con ACLF (0.97 mg/dL [IQR 0.77 – 1.33] vs. 0.67 mg/dL [IQR 0.56 – 0.70] y 0.70 mg/dL [IQR 0.60 – 0.81] en aquellos con CC y DC, respectivamente;  $p < 0.0001$ ). En concordancia, el score MELD-Na presenta diferencias entre los grupos, siendo más alto en ACLF seguido de los pacientes con DC y CC ( $26 \pm 6$  vs.  $19 \pm 4$  vs.  $11 \pm 3$ , respectivamente,  $p < 0.0001$ ). Una cuenta más alta de leucocitos se observó tanto en DC como en ACLF cuando se compararon contra CC ( $p = 0.019$  cada uno).

**TABLA 9. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS.**

**POBLACIÓN CON TRASPLANTE HEPÁTICO CON MUESTRA BIOLÓGICA ANALIZADA (n= 129)**

	Control n= 10	Pacientes CC n= 9	Pacientes DC n= 59	Pacientes ACLF n= 61	<i>p</i>
Sexo masculino	4 (40.0%)	5 (55.6%)	24 (40.7%)	26 (42.6%)	0.845
Edad, años	47.0 (44.8 – 52.3)	59.0 (53.5 – 60.0) <sup>b</sup>	52.0 (41.0 – 60.0)	51.0 (39.0 – 57.0) <sup>b</sup>	0.047
IMC	22.47 (21.67 – 24.20)	28.26 (25.78 – 30.01)	26.27 (22.92 – 29.86)	24.66 (22.66 – 26.51)	0.072
Creatinina (mg/dL)	0.78 (0.69 – 0.89)	0.67 (0.56 – 0.70) <sup>b</sup>	0.70 (0.60 – 0.81) <sup>c</sup>	0.97 (0.77 – 1.33) <sup>b,c</sup>	< 0.0001
<b>Etiología de la cirrosis, n (%)</b>					
Autoinmune †	—	1 (11.1%)	19 (32.2%)	27 (44.3%)	0.100
VHC	—	6 (66.7%)	16 (27.1%)	8 (13.1%)	0.002
Enfermedad hepática alcohólica	—	1 (11.1%)	5 (8.5%)	3 (4.9%)	0.463
NASH	—	0 (0.0%)	3 (5.1%)	4 (6.6%)	0.999
Criptogénica	—	1 (11.1%)	9 (15.3%)	13 (21.3%)	0.667
Otras ‡	—	0 (0.0%)	7 (11.9%)	6 (9.8%)	0.737
<b>Datos clínicos y de laboratorio</b>					
Ascitis	—	0 (0.0%) <sup>a,b</sup>	41 (69.5%) <sup>a,c</sup>	56 (91.8%) <sup>b,c</sup>	< 0.0001
Encefalopatía	—	0 (0.0%) <sup>a,b</sup>	27 (45.8%) <sup>a,c</sup>	49 (80.3%) <sup>b,c</sup>	< 0.0001
MELD-Na	—	11 ± 3 <sup>a,b</sup>	19 ± 4 <sup>a,c</sup>	26 ± 6 <sup>b,c</sup>	< 0.0001
Bilirrubina total (mg/dL)	—	1.18 (0.98 – 1.78) <sup>a,b</sup>	3.34 (2.14 – 5.71) <sup>a,c</sup>	7.54 (4.21 – 22.29) <sup>b,c</sup>	< 0.0001
AST (U/L)	—	58.0 (40.5 – 103.0)	75.0 (51.0 – 118.0)	69.0 (43.0 – 144.0)	0.537
ALT (U/L)	—	47.0 (31.5 – 83.0)	47.9 (29.1 – 81.9)	35.9 (24.0 – 77.7)	0.308
INR	—	1.1 (1.1 – 1.3) <sup>a,b</sup>	1.5 (1.3 – 1.6) <sup>a,c</sup>	1.7 (1.4 – 2.1) <sup>b,c</sup>	< 0.0001
Leucocitos (×10 <sup>9</sup> /L)	—	2.5 (2.05 – 3.6)	3.8 (3.0 – 6.6)	4.3 (3.0 – 5.8)	0.051

† Incluye hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y síndromes de sobreposición.

‡ Otras etiologías incluyen cirrosis biliar secundaria, daño hepático inducido por fármacos (DILI), y enfermedades hepáticas congénitas.

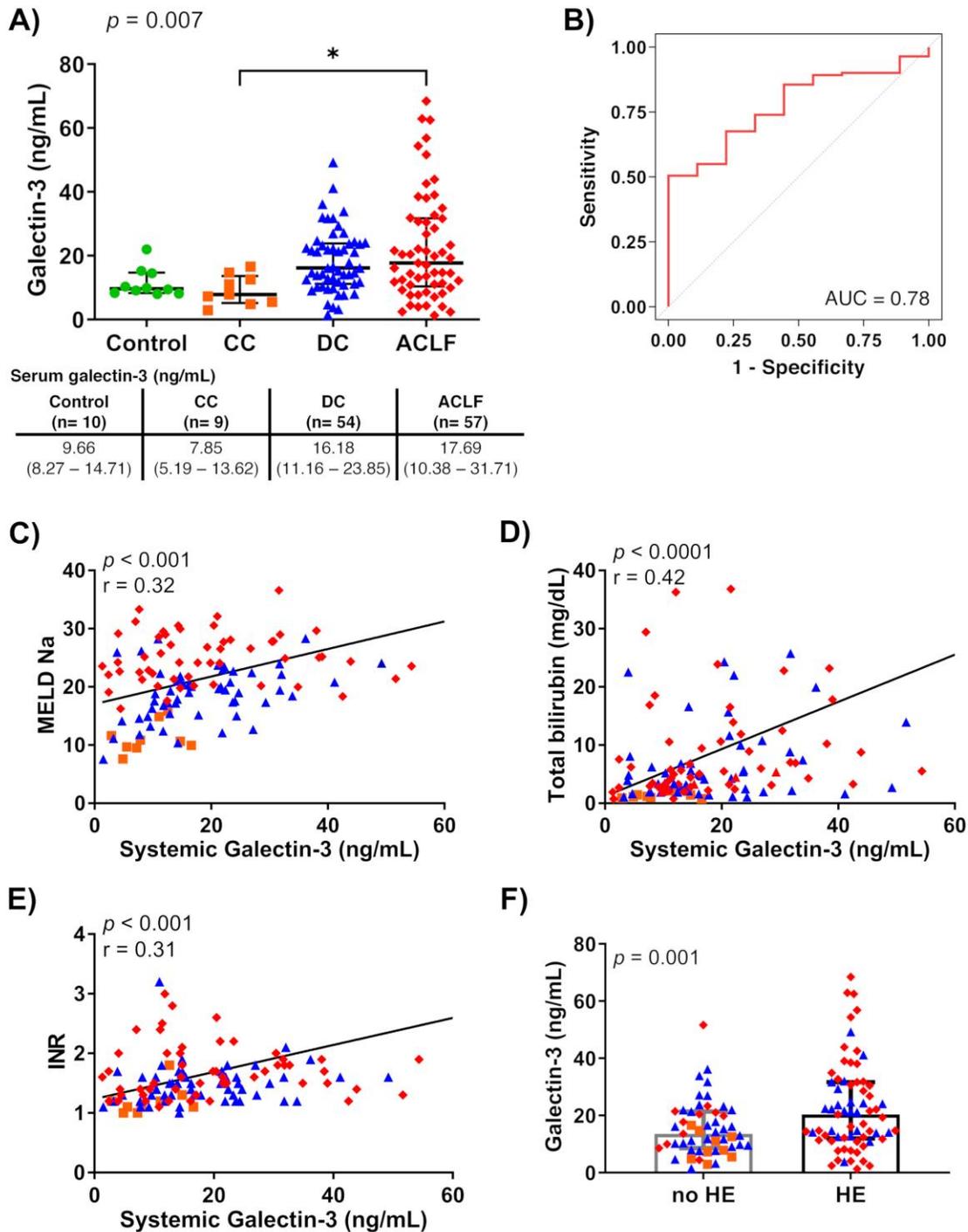
Los datos se reportan como n (%), medias (SD) y medianas (IQR). Comparaciones significativas se muestran entre CC y DC (<sup>a</sup>), CC y ACLF (<sup>b</sup>), y DC y ACLF (<sup>c</sup>). ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; CC, cirrosis compensada; DC, cirrosis descompensada; VHC, virus de la hepatitis C; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; MELD-Na, Model for End-Stage Liver Disease-Sodium; INR, International Normalized Ratio.

#### 4.3.2 Niveles de galectina-3 sistémicos discriminan cirrosis avanzada y correlacionan con la gravedad de la enfermedad hepática

Para determinar la asociación entre cirrosis avanzada (DC y ACLF) y los niveles de galectina-3 sistémicos, se midieron muestras de suero de todos los pacientes, las cuales fueron procuradas en el momento de ser sometidos a trasplante hepático. La correlación entre estas mediciones de galectina-3 con la gravedad de la enfermedad determinada por el score MELD-Na fue posteriormente analizada. La galectina-3 sistémica se encontró significativamente elevada en pacientes con cirrosis en comparación con los controles sanos ( $p= 0.007$ ). Aquellos con cirrosis avanzada tuvieron los valores más altos (17.69 ng/mL en ACLF [10.38 – 31.71] y 16.18 ng/mL en DC [11.16 – 23.85]), mientras que niveles más bajos se observaron en el grupo de CC (7.85 ng/mL [5.19 – 13.62]) y en los controles (9.66 ng/mL [8.27 – 14.71]). Específicamente, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con ACLF y aquellos con cirrosis compensada después de una prueba de comparación múltiple (**Figura 13A**). Los niveles de galectina-3 al momento del trasplante tuvieron poder predictivo significativo para discriminar entre pacientes con cirrosis avanzada y CC (AUC= 0.78, 95% CI 0.66 – 0.89,  $p= 0.006$ ) (**Figura 13B**). Se identificó un valor  $>12.57$  ng/mL como punto de corte óptimo (67.6% sensibilidad y 77.8% especificidad).

La galectina-3 en suero mostró además una correlación positiva significativa con el score MELD-Na ( $r= 0.32$ ,  $p < 0.001$ ) así como con parámetros clínicos de cirrosis relevantes incluyendo los niveles de bilirrubina total ( $r= 0.42$ ,  $p < 0.0001$ ) y el INR ( $r= 0.31$ ,  $p < 0.001$ ) (**Figura 13 C-E**). Adicionalmente, los pacientes que presentaron por lo menos un episodio de encefalopatía durante su curso clínico previo a recibir un trasplante hepático tuvieron niveles sistémicos de galectina-3 más altos (20.39 ng/mL [11.97 – 31.66] vs. 13.57 ng/mL [8.56 – 21.34];  $p= 0.001$ ; **Figura 13F**), todo lo cual indica que la galectina-3 se puede usar como un marcador alternativo que refleja la descompensación y por tanto la gravedad de la enfermedad.

**FIGURA 13**



**Figura 13. Niveles de galectina-3 sistémicos discriminan cirrosis avanzada y correlacionan con la gravedad de la enfermedad hepática. A)** Niveles de galectina-3 en suero entre los estadios de cirrosis (medianas; las barras representan la percentila 25%, mediana y percentila 75%). Solo se muestran combinaciones de comparaciones múltiples con significancia: \*  $p < 0.05$  (prueba de Kruskal-Wallis). **B)** Curva ROC demostrando el poder discriminativo de la galectina-3 entre cirrosis avanzada y CC. **C), D)** y **E)** correlaciones clínicas (coeficiente de Spearman). **F)** Niveles séricos de galectina-3 entre pacientes que presentaron o no por lo menos un episodio de encefalopatía (las cajas indican los niveles en medianas y las barras las percentilas 25% y 75%); U de Mann-Whitney). Sujetos sanos (n= 10) dentro del rango de edad de estos pacientes sirvieron como controles (n= 10). ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (n= 57); CC, cirrosis compensada (n= 9); DC, cirrosis descompensada (n= 54); HE, encefalopatía hepática; INR, International Normalized Ratio; MELD-Na, Model for End-Stage Liver Disease-Sodium.

#### 4.3.3 La expresión hepática de galectina-3 discrimina a pacientes con cirrosis avanzada y correlaciona con la gravedad de la enfermedad y la inflamación intrahepática

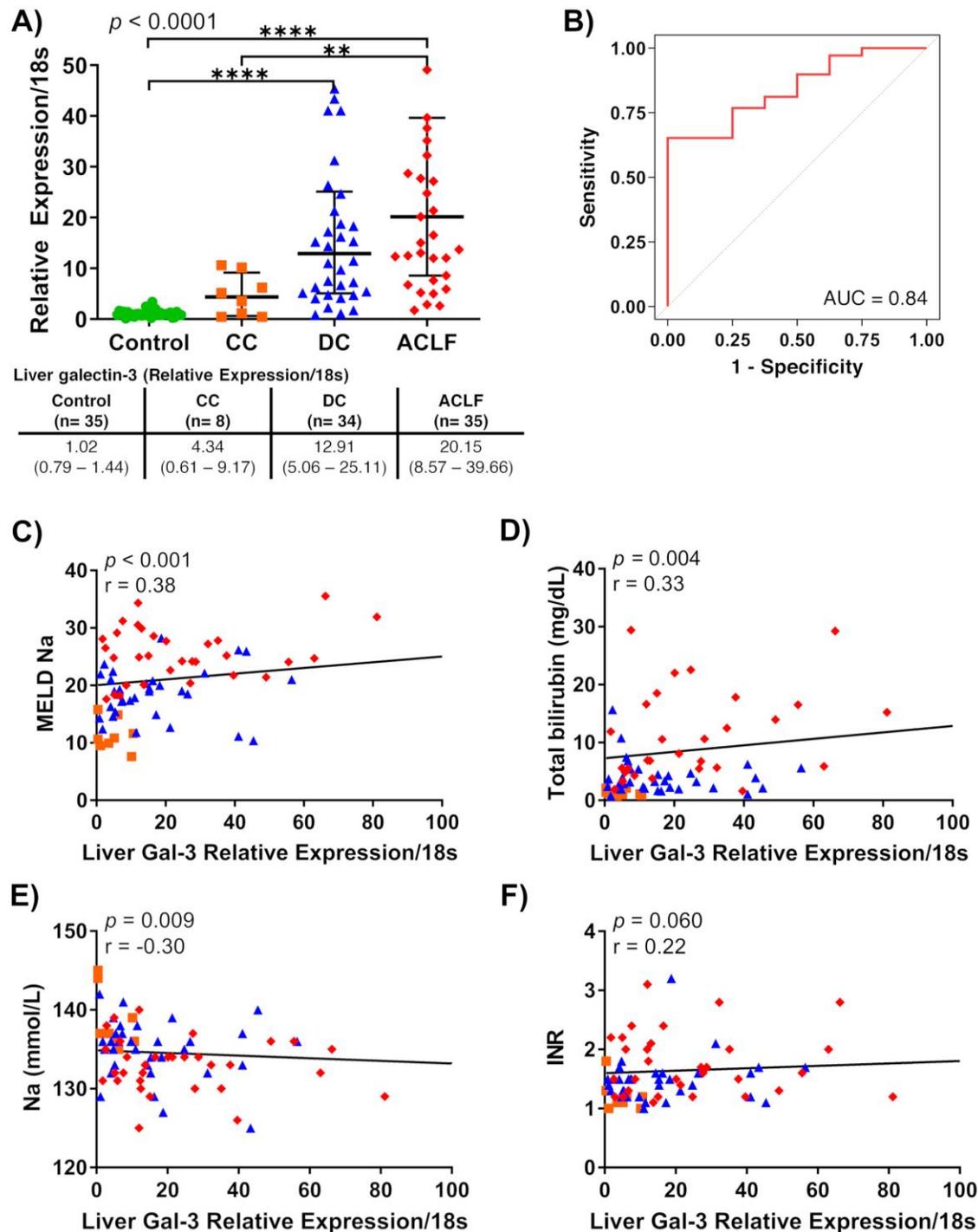
Debido a que la galectina-3 en suero se asoció con el estado de enfermedad, nos preguntamos si la galectina-3 intrahepática se correlacionaría también con la gravedad de la cirrosis y aún más importante, si reflejaría el estado de inflamación intrahepática. Se encontró que los pacientes con cirrosis avanzada tuvieron la expresión relativa de galectina-3 más alta ( $p < 0.0001$ ) y diferencias significativas se encontraron entre los donadores (1.02 [0.79 – 1.44]) y aquellos con ACLF (20.15 [8.57 – 39.66]) y DC (12.91 [5.06 – 25.11]), y también entre ACLF y CC (4.34 [0.61 – 9.17]) (**Figura 14A**). Asimismo, la galectina-3 intrahepática mostró poder significativo para discriminar a pacientes con cirrosis avanzada con un importante AUC (AUC= 0.84, 95% CI 0.72 – 0.95,  $p= 0.002$ ) (**Figura 14B**).

La expresión del ARNm de galectina-3 en hígado se asoció también con una mayor gravedad de cirrosis. Encontramos una correlación positiva y significativa con el score MELD-Na ( $r= 0.38$ ,  $p < 0.001$ ; **Figura 14C**) y con la bilirrubina total ( $r= 0.33$ ,  $p= 0.004$ ; **Figura 14D**), mientras que con los niveles de sodio existe una correlación negativa ( $r= -0.30$ ,  $p= 0.009$ ; **Figura 14E**). La correlación con el INR no fue significativa ( $r= 0.22$ ,  $p= 0.060$ ; **Figura 14F**).

Considerando la relevancia de la respuesta inmunológica innata en pacientes cirróticos que se descompensan y ante la falta de evidencia sobre la participación hepática en este fenómeno, se analizó adicionalmente en los pacientes trasplantados la expresión intrahepática de la citocina proinflamatoria IL-6, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) y M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) (ambos marcadores de infiltración y activación de monocitos), así como aquella de IL-8, CD66b y mieloperoxidasa (MPO) (todos marcadores de neutrófilos). De acuerdo con estos análisis, los pacientes con cirrosis avanzada mostraron inflamación intrahepática grave con una expresión significativamente mayor de IL-6 ( $p < 0.0001$ ; **Figura 15A**), MCP-1 ( $p < 0.0001$ ; **Figura 15B**), M-CSF ( $p < 0.001$ ; **Figura 15C**), e IL-8 ( $p < 0.0001$ ; **Figura 15D**) en comparación con aquellos con CC y los donadores (**Tabla 10**). Al comparar con el grupo de CC, la IL-6 se encontró más elevada en pacientes con DC mientras que MCP-1 en aquellos con ACLF.

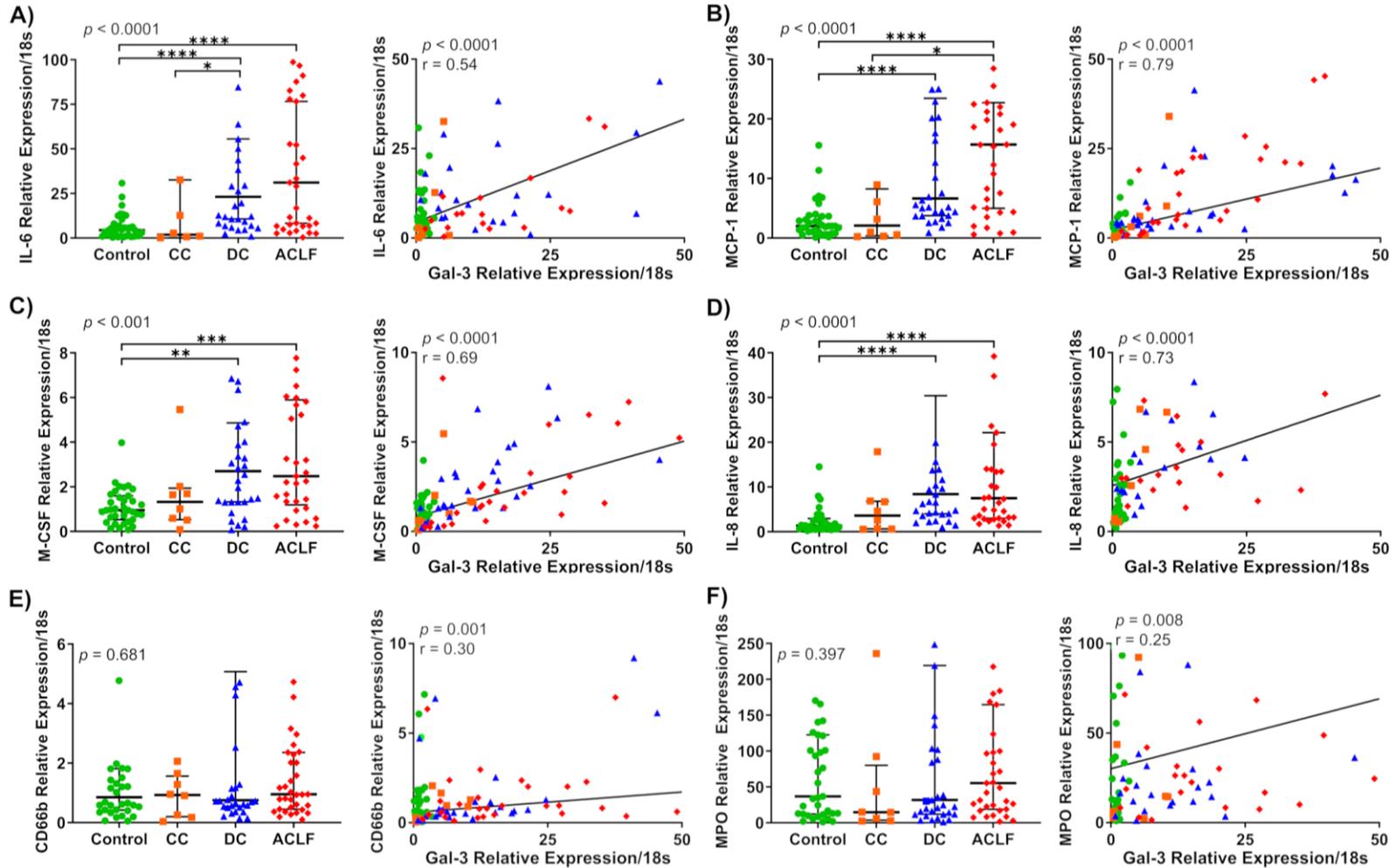
La galectina-3 intrahepática correlacionó fuertemente con todos estos marcadores de inflamación analizados (IL-6,  $r= 0.54$ ,  $p < 0.0001$ ; MCP-1,  $r= 0.79$ ,  $p < 0.0001$ ; M-CSF,  $r= 0.69$ ,  $p < 0.0001$ ; IL-8,  $r= 0.73$ ,  $p < 0.0001$ ) (**Figura 15 A-D**). A pesar de que la expresión tanto de MPO como de CD66b, un marcador de activación en neutrófilos y potencial receptor de galectina-3 (109, 110), fue similar entre los pacientes con cirrosis y los donadores (**Figura 15 E-F y Tabla 10**), se encontraron también correlaciones positivas y significativas con la expresión de galectina-3 (CD66b,  $r= 0.30$ ,  $p= 0.001$ ; y MPO,  $r= 0.25$ ,  $p= 0.008$ ; **Figura 15 E-F**, respectivamente).

**FIGURA 14**



**Figura 14. La expresión hepática de galectina-3 discrimina a pacientes con cirrosis avanzada y correlaciona con la gravedad de la enfermedad. A)** Niveles de expresión relativos de galectina-3 entre todos los estadios de cirrosis (las barras representan la percentila 25%, mediana y percentila 75%). Solo se muestran combinaciones de comparaciones múltiples con significancia: \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (prueba de Kruskal-Wallis). **B)** Curva ROC demostrando el poder de discriminación de la expresión relativa de galectina-3 en el hígado entre cirrosis avanzada y CC. **C), D), E)** y **F)** correlaciones clínicas (coeficiente de Spearman). ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (n= 35); Controles (n= 35); CC, cirrosis compensada (n= 8); DC, cirrosis descompensada (n= 34); INR, International Normalized Ratio; MELD-Na, Model for End-Stage Liver Disease Sodium.

**FIGURA 15**



**Figura 15. La expresión hepática de galectina-3 correlaciona con la expresión intrahepática de marcadores de inflamación en cirrosis. A) – F) Niveles de expresión hepática relativos de IL-6 y marcadores de infiltrado inflamatorio por neutrófilos y monocitos (las barras representan la percentila 25%, mediana y la percentila 75%). Solo se muestran combinaciones de comparaciones múltiples con significancia: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (prueba de Kruskal-Wallis). A lado de cada figura se enseñan las correlaciones con la expresión relativa de galectina-3 (coeficiente de Spearman). Controles ( $n = 35$ ), CC, cirrosis compensada ( $n = 8$ ); DC, cirrosis descompensada ( $n = 34$ ); ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica ( $n = 35$ ); MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MPO, mieloperoxidasa.**

**TABLA 10. ANÁLISIS DE qPCR PARA MARCADORES DE INFLAMACIÓN  
MUESTRAS DE HÍGADO DE PACIENTES CIRRÓTICOS Y DONADORES CADAVÉRICOS**

	<b>Control</b> n= 35	<b>CC</b> n= 8	<b>DC</b> n= 34	<b>ACLF</b> n= 35	<b>p</b>
<b>IL-6</b>	4.45 (1.18 – 8.03) <sup>a,b</sup>	1.91 (0.57 – 17.7) <sup>c</sup>	23.09 (8.05 – 99.7) <sup>a,c</sup>	31.13 (6.68 – 82.71) <sup>b</sup>	< 0.0001
<b>MCP-1</b>	2.01 (1.00 – 3.66) <sup>a,b</sup>	2.08 (0.36 – 8.23) <sup>d</sup>	6.64 (3.77 – 23.46) <sup>a</sup>	15.69 (4.99 – 22.71) <sup>b,d</sup>	< 0.0001
<b>M-CSF</b>	0.95 (0.53 – 1.60) <sup>a,b</sup>	1.33 (0.53 – 1.94)	2.70 (1.32 – 4.87) <sup>a</sup>	2.48 (1.19 – 5.9) <sup>b</sup>	< 0.001
<b>IL-8</b>	1.35 (0.71 – 2.97) <sup>a,b</sup>	3.58 (0.61 – 6.80)	8.37 (3.99 – 30.43) <sup>a</sup>	7.49 (2.99 – 22.14) <sup>b</sup>	< 0.0001
<b>CD66b</b>	0.85 (0.42 – 1.81)	0.61 (0.14 – 1.76)	0.75 (0.54 – 5.07)	0.95 (0.45 – 2.36)	0.68
<b>MPO</b>	36.77 (12.25 – 122.5)	14.65 (3.655 – 80.15)	31.77 (12.06 – 219.2)	55.31 (18.83 – 164.6)	0.40

Los datos se reportan como medianas (IQR). Comparaciones significativas se muestran entre controles y DC (<sup>a</sup>), controles y ACLF (<sup>b</sup>), CC y DC (<sup>c</sup>), CC y ACLF (<sup>d</sup>) (Pruebas de Kruskal-Wallis). ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; CC, cirrosis compensada; DC, cirrosis descompensada; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MPO, mieloperoxidasa.

#### 4.3.4 La inmunotinción positiva de galectina-3 en los hepatocitos es característica en pacientes con cirrosis avanzada

Para determinar la existencia de un patrón específico de expresión intrahepática de galectina-3 asociado con la gravedad de la enfermedad, se realizaron inmunotinciones de galectina-3 en las muestras de hígado de todos los pacientes. En el hígado control de los donadores, la galectina-3 solo fue positiva en las células de Kupffer y en las células de los conductos biliares, mientras que en los hígados cirróticos se encontró positividad adicional en los hepatocitos. La principal diferencia entre los diferentes estadios de cirrosis fue la cantidad e intensidad del área positiva a galectina-3 en hepatocitos y colangiocitos. Mientras que en la mayoría de estos pacientes los nódulos de regeneración eran por lo general positivos en la periferia, en los pacientes con DC y ACLF se observaron adicionalmente hepatocitos positivos a galectina-3 en el centro de los nódulos. Asimismo, las reacciones ductulares que son comunes en aquellos con cirrosis avanzada también mostraron ser positivas a galectina-3 (**Figura 16 A-D**).

De acuerdo con análisis cuantitativos, aquellos con DC y ACLF mostraron tener el mayor número de células positivas a galectina-3 ( $p= 0.002$ ) y se observó una diferencia significativa entre ACLF y controles después de una prueba de comparación múltiple (ACLF 7.75% [5.18 – 10.91], controles 0.08% [0.02 – 0.38]; CC 2.12% [1.27 – 5.04], y DC 4.75% [1.86 – 10.35]) (**Figura 16E**). Además, se encontró una correlación positiva entre la expresión de galectina-3 analizada por qPCR y aquella determinada por inmunohistoquímica ( $r= 0.36$ ,  $p= 0.023$ ; **Figura 16F**).

#### 4.3.5 Se confirma una elevada expresión de galectina-3 intrahepática en una cohorte externa de pacientes con hepatitis alcohólica grave

Posteriormente, con el fin de corroborar los hallazgos obtenidos, se analizaron los datos de RNAseq de muestras de hígado procuradas al momento del diagnóstico de una cohorte externa de pacientes con AH temprana o grave. Los datos demográficos de esta cohorte se muestran en la **Tabla 11**, en la que se observan diferencias significativas entre los pacientes con respecto al score MELD, los niveles de creatinina y bilirrubina, el INR, la cuenta de leucocitos y la presencia de ascitis. Los pacientes con AH grave tuvieron un número significativamente más elevado de copias de ARNm de galectina-3 en comparación con aquellos con AH temprana y muestras de hígado sano (12.89 [IQR 9.79 – 22.00] vs. 3.74 [IQR 2.21 – 5.38] y 3.12 [IQR 2.65 – 4.34], respectivamente,  $p< 0.0001$ ; **Figura 17A**). Esto se refleja en una curva ROC significativa en la que la expresión por ARNm de galectina-3 en el hígado tuvo poder para discriminar entre AH temprana y grave (AUC= 0.95, 95% CI 0.89 – 1.00,  $p< 0.0001$ ; **Figura 17B**). Adicionalmente, mayor inflamación intrahepática se encontró también en pacientes con AH grave debido a una expresión más elevada de IL-6 ( $p< 0.0001$ ), MCP-1 ( $p< 0.0001$ ), M-CSF ( $p< 0.001$ ) e IL-8 ( $p< 0.0001$ ). Confirmando además una fuerte asociación entre galectina-3 y la inflamación intrahepática observada en los pacientes con enfermedad avanzada, se encontraron correlaciones significativas entre la expresión de galectina-3 intrahepática y cada uno de estos marcadores de inflamación (IL-6,  $r= 0.68$ ,  $p< 0.0001$ ; MCP-1,  $r= 0.83$ ,  $p< 0.0001$ ; M-CSF,  $r= 0.50$ ,  $p< 0.001$ ; IL-8,  $r= 0.83$ ,  $p< 0.0001$ ) (**Figura 17C-F**).

FIGURA 16

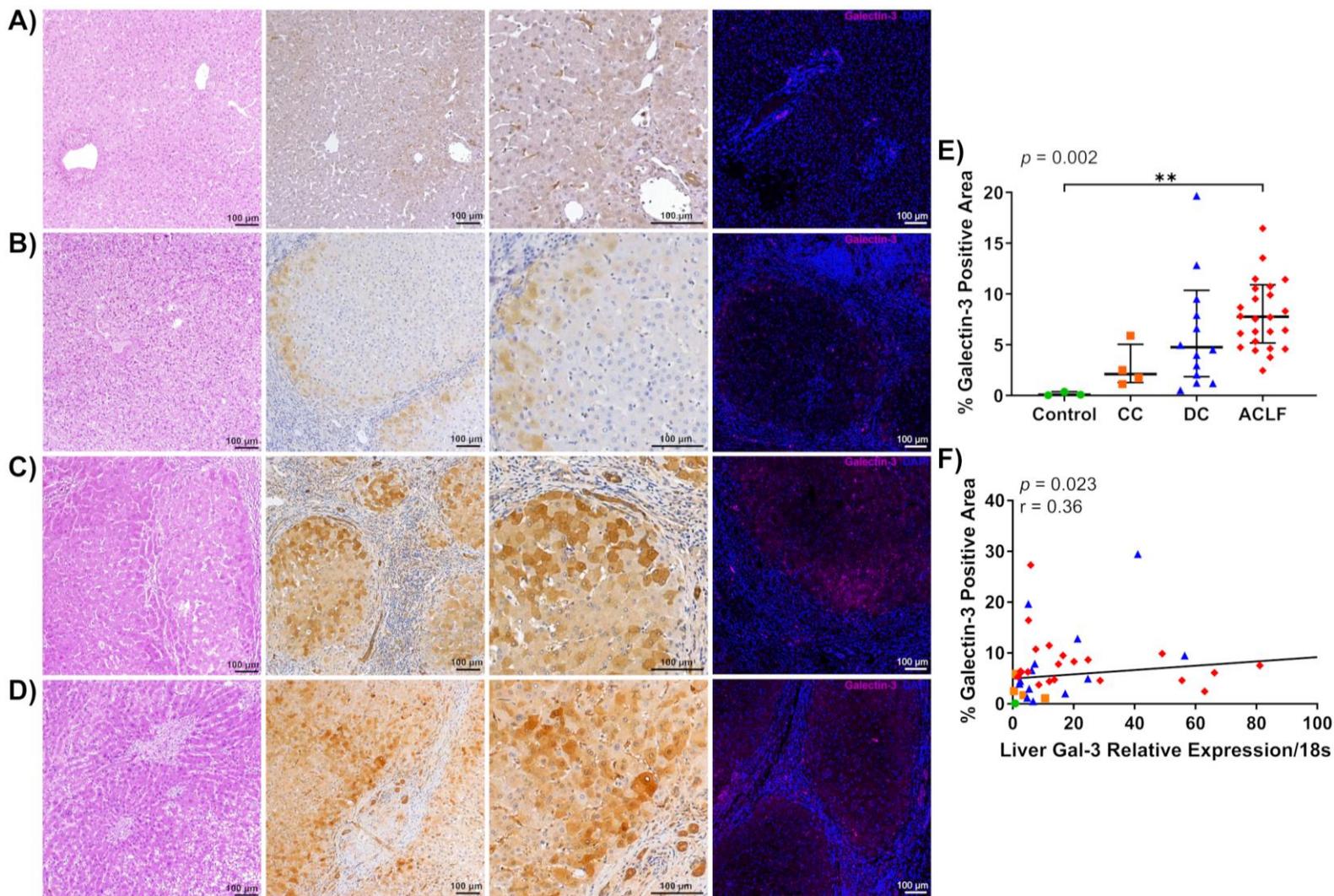


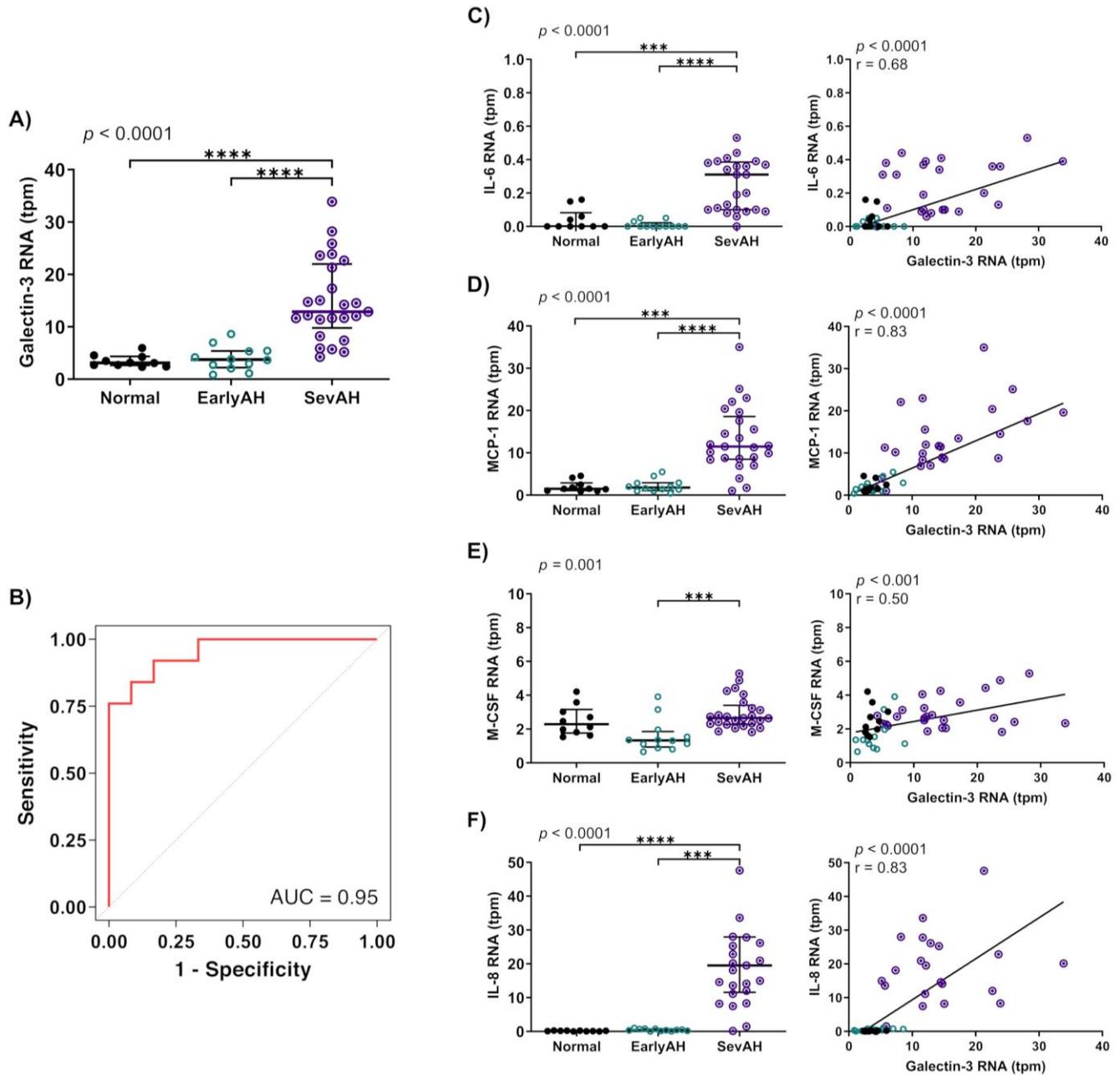
Figura 16. La tinción positiva de galectina-3 en los hepatocitos es característica en pacientes con cirrosis avanzada. Se muestran fotos representativas con magnificación 10x de secciones de tejido hepático teñidas (de izquierda a derecha) con hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica de galectina-3 con una sección ampliada que enseña hepatocitos y colangiocitos altamente positivos, e inmunofluorescencia de galectina-3 de: **A)** hígado control de donador sano; **B)** cirrosis compensada; **C)** cirrosis descompensada; y **D)** insuficiencia hepática aguda sobre crónica. **E)** Porcentaje de área positiva a galectina-3 por grupo de cirrosis de acuerdo con mediciones realizadas con *Fiji* (las barras representan la percentila 25%, mediana y la percentila 75%). Solo se muestran combinaciones de comparaciones múltiples con significancia: \*\*  $p < 0.01$  (prueba de Kruskal-Wallis). **F)** Correlación entre la expresión relativa de galectina-3 en hígado y aquella analizada por inmunohistoquímica (coeficiente de Spearman). Controles (n= 3), CC, cirrosis compensada (n= 4); DC, cirrosis descompensada (n= 14); ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (n= 26).

**TABLA 11. DEMOGRAFÍA DE LA COHORTE EXTERNA (n= 37)  
PACIENTES CON HEPATITIS ALCOHÓLICA ANALIZADOS POR SECUENCIACIÓN DE ARN**

	<b>Control</b> n= 10	<b>AH temprana</b> n= 12	<b>AH grave</b> n= 25	<b>p</b>
Sexo masculino	7 (70.0%)	7 (58.3%)	17 (68.0%)	0.564
Edad, años	32.0 (28.8 – 50.8)	52.0 (48.3 – 58.8)	49.0 (41.5 – 57.5)	0.306
Creatinina sérica (mg/dL)	0.84 (0.74 – 0.90)	0.60 (0.58 – 0.81)	0.98 (0.71 – 1.36)	0.011
<b>Datos clínicos y de laboratorio</b>				
Ascitis	—	0 (0.0%)	19 (76.0%)	< 0.0001
Encefalopatía	—	0 (0.0%)	6 (24.0%)	0.149
MELD	—	7 ± 1	27 ± 6	< 0.0001
Bilirrubina total (mg/dL)	—	1.20 (0.73 – 1.45)	19.60 (13.25 – 27.95)	< 0.0001
INR	—	0.99 (0.91 – 1.02)	1.79 (1.58 – 2.22)	< 0.0001
Leucocitos (×10 <sup>9</sup> /L)	—	5.60 (4.60 – 7.18)	10.00 (8.14 – 14.89)	0.001

Los datos se reportan como n (%), medias (SD) y medianas (IQR). Las comparaciones se realizaron entre AH temprana y grave (pruebas  $\chi^2$  o exacta de Fisher, y U de Mann-Whitney o t de Student). AH, hepatitis alcohólica; MELD-Na, Model for End-Stage Liver Disease-sodium; INR, international normalized ratio.

FIGURA 17



**Figura 17. Se confirma una elevada expresión de galectina-3 intrahepática en una cohorte externa de pacientes con hepatitis alcohólica grave. A)** Abundancia del ARN de galectina-3 en transcritos por millón (tpm) entre hígados normales y pacientes con AH temprana y grave (las barras representan la percentila 25%, mediana y percentila 75%). Solo se muestran combinaciones de comparaciones múltiples con significancia:  $*** p < 0.001$  y  $**** p < 0.0001$  (prueba de Kruskal-Wallis). **B)** Curva ROC demostrando el poder de discriminación del ARN de galectina-3 entre AH temprana y grave. **C) – F)** Abundancia del ARN de IL-6, MCP-1, M-CSF e IL-8 en tpm entre hígados normales y pacientes con AH temprana y grave. A lado de cada gráfica se enseñan las correlaciones con los tpm de galectina-3 (coeficiente de Spearman). Controles (n= 10), AH temprana (n= 12), AH grave (n= 25). AH, hepatitis alcohólica, MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MPO, mieloperoxidase.

#### 4.3.6 La evaluación pretrasplante de la galectina-3 sistémica ayuda a predecir complicaciones infecciosas en el periodo postrasplante

Debido al papel central de la galectina-3 como inmunomodulador, se decidió examinar su potencial uso clínico en pacientes que reciben un trasplante hepático. La presencia de SIRS durante la semana previa a dicho procedimiento y el desarrollo de infecciones postrasplante durante la estancia hospitalaria inmediata hasta el egreso se analizaron en cada paciente.

Una mayor proporción de pacientes con ACLF cumplieron con criterios de SIRS (47.4% vs. 13.0% DC y 0.0% CC;  $p < 0.0001$ ) y las complicaciones infecciosas también fueron más frecuentes en este grupo (43.9% vs. 22.2% DC y 11.1% CC;  $p = 0.019$ ) (**Figura 18A**). Las complicaciones infecciosas fueron de origen bacteriano con una mediana de tiempo a su aparición de 4 días (IQR 2 – 8) posterior al trasplante hepático. De manera importante, el régimen inmunosupresor que se administró después del procedimiento fue similar entre los pacientes, recibiendo todos ( $n = 106$  [82.2%]) o una combinación ( $n = 23$  [17.8%]) de los siguientes medicamentos: un inhibidor de la calcineurina, (tacrolimus o ciclosporina), corticoesteroides, mofetil micofenolato y el antagonista del receptor de interleucina-2 (IL-2) basiliximab.

Se encontraron niveles elevados de galectina-3 en pacientes que presentaron SIRS en el periodo pretrasplante (21.61 ng/mL [10.14 – 38.63] vs. 14.40 ng/mL [10.19 – 22.64];  $p = 0.037$ ) (**Figura 18B**) y en aquellos que desarrollaron complicaciones infecciosas en el postrasplante (20.95 ng/mL [11.57 – 31.88] vs. 14.51 ng/mL [8.98 – 22.64];  $p = 0.026$ ) (**Figura 18C**). De esta manera, los niveles de galectina-3 séricos al momento del trasplante discriminaron de manera significativa entre pacientes que desarrollaron infecciones en el postrasplante (AUC= 0.63, 95% CI 0.52 – 0.74,  $p = 0.027$ ). Se identificó un valor  $>16.58$  ng/mL como punto de corte óptimo (65.8% sensibilidad y 62.2% especificidad).

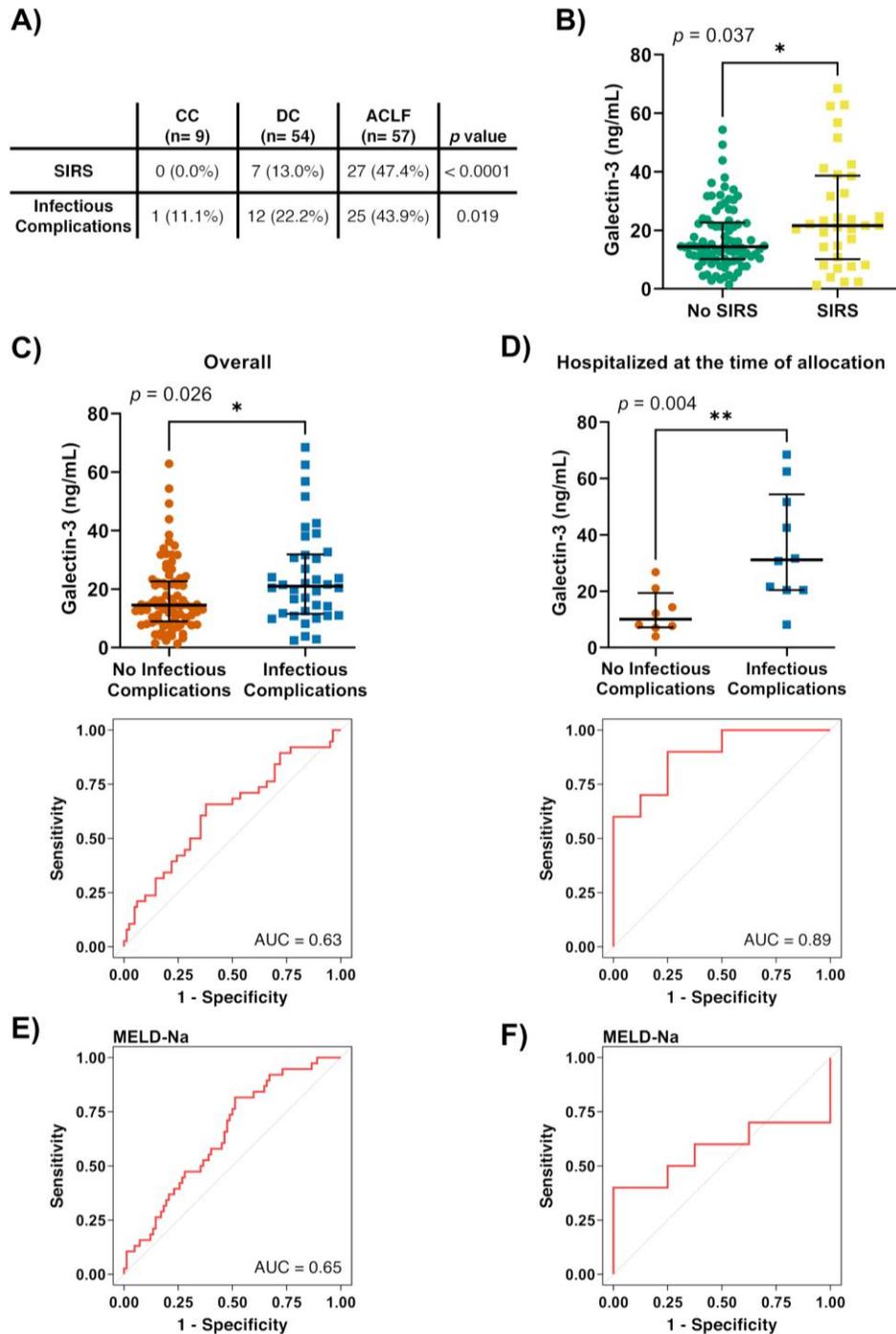
Las diferencias entre los niveles de galectina-3 fueron más claras en un subanálisis de pacientes que estaban siendo tratados debido a un evento de descompensación y por tanto ya se encontraban hospitalizados en el día de su trasplante (31.14 ng/mL [IQR 20.43 – 54.36] vs. 10.10 ng/mL [IQR 7.17 – 19.37];  $p = 0.004$ ) (**Figura 18D**). Estos pacientes ya llevaban una mediana de 11 días (IQR 5.75 – 14.25) hospitalizados antes de recibir un trasplante. El poder de discriminación de galectina-3 fue aún mayor en este subgrupo de pacientes (AUC= 0.89, 95% CI 0.74 – 1.00,  $p = 0.006$ ) con un punto de corte óptimo  $>17.37$  ng/mL, con mayor sensibilidad (90.0%) y especificidad (75.0%).

Con base en la asociación reportada entre el score MELD y el desarrollo de infecciones en el postrasplante (111-113), se evaluó la habilidad del score MELD-Na para discriminar a pacientes que desarrollan complicaciones infecciosas. Se encontró que el MELD-Na con un punto de corte óptimo  $>20.0$  tuvo poder de discriminación significativo en el grupo general de pacientes con un AUC de 0.65 (95% CI 0.55 – 0.75,  $p = 0.01$ ) (**Figura 18E-F**).

De acuerdo con análisis de regresión de Cox, tomando en cuenta el tiempo al desarrollo de alguna infección desde el trasplante hepático hasta que el paciente es dado de alta, la presencia de un score MELD-Na >20.0 o SIRS y concomitantemente niveles de galectina-3 >16.58 ng/mL otorga una razón de riesgos (HR) para complicaciones infecciosas en el periodo postrasplante de 3.24 y 3.94, respectivamente. Se encontraron interacciones significativas entre todas estas tres variables, lo que indica su fuerte interrelación para este desenlace. Por lo tanto, cuando un paciente presenta las tres variables de manera simultánea (galectina-3 >16.58 ng/mL \* MELD-Na >20.0 \* SIRS) la HR es significativamente mayor con un valor de 4.60 ([2.38 – 8.90],  $p < 0.0001$ ) (**Tabla 12A**).

En el subanálisis con pacientes que ya se encontraban hospitalizados antes de recibir un trasplante únicamente la galectina-3 con el punto de corte óptimo >17.37 ng/mL obtuvo significancia estadística con una HR de 9.59 (95% CI 1.18 – 78.07,  $p = 0.04$ ) a diferencia del score MELD-Na y SIRS los cuales perdieron su significancia. (**Tabla 12B**)

FIGURA 18



**Figura 18. La evaluación pretrasplante de la galectina-3 sistémica ayuda a predecir complicaciones infecciosas en el periodo postrasplante. A)** Frecuencias de pacientes con CC, DC y ACLF que presentaron SIRS durante la semana previa al trasplante y aquellos que desarrollaron complicaciones infecciosas en el postrasplante. **B)** Niveles séricos de galectina-3 entre pacientes que presentaron o no SIRS (las barras representan la percentila 25%, mediana y percentila 75%; \*  $p < 0.05$  y [U de Mann-Whitney]). **C)** Niveles séricos de galectina-3 entre pacientes que desarrollaron complicaciones infecciosas o no en el postrasplante en la población general y en un subanálisis de pacientes hospitalizados en el día de su trasplante **D)**. Se muestran abajo de estas gráficas curvas ROC para cada análisis, demostrando el poder discriminativo de la galectina-3 sérica para infecciones postrasplante. Aquellas curvas ROC que enseñan el poder discriminativo del score MELD-Na se muestran en **E)** para la población general y en **F)** para los pacientes hospitalizados en el día de su trasplante. ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica; CC, cirrosis compensada; DC, cirrosis descompensada; LT, trasplante hepático; MELD-Na, model for end-stage liver disease sodium; SIRS, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

**TABLA 12. MODELOS UNIVARIADOS DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX PARA COMPLICACIONES INFECCIOSAS EN EL POSTRASPLANTE**

**A) Población general**

Variable	Univariado		
	Hazard Ratio	95% CI	<i>p</i>
Galectina-3, >16.58 ng/mL	2.19	(1.12 – 4.29)	<b>0.02</b>
MELD-Na, >20.0	2.78	(1.22 – 6.31)	<b>0.02</b>
SIRS	2.77	(1.45 – 5.24)	<b>&lt; 0.01</b>
Galectina-3 >16.58 ng/mL * MELD-Na > 20.0	3.24	(1.69 – 6.22)	<b>&lt; 0.001</b>
Galectina-3 >16.58 ng/mL * SIRS	3.94	(2.05 – 7.57)	<b>&lt; 0.0001</b>
Galectina-3 >16.58 ng/mL * MELD-Na > 20.0 * SIRS	4.60	(2.38 – 8.90)	<b>&lt; 0.0001</b>

**B) Pacientes hospitalizados en el día del trasplante**

Variable	Univariado		
	Hazard Ratio	95% CI	<i>p</i> value
Galectina-3 >17.37 ng/mL	9.59	(1.18 – 78.07)	<b>0.04</b>
MELD-Na	0.95	(0.85 – 1.06)	<b>0.39</b>
SIRS	1.82	(0.23 – 14.45)	<b>0.57</b>

#### 4.3.7 DISCUSIÓN. La galectina-3 se encuentra sobre-expresada en pacientes con cirrosis avanzada y predice complicaciones infecciosas posteriores al trasplante hepático

La decisión sobre qué pacientes con cirrosis son elegibles para recibir un trasplante hepático es una tarea complicada, especialmente cuando se evalúa quién se beneficiará más de este procedimiento. Esta decisión es particularmente difícil de acuerdo con la histórica escasez mundial de órganos y por lo tanto involucra una evaluación exhaustiva de la gravedad de la enfermedad y el riesgo de mortalidad en la lista de espera, e idealmente debería considerar también una estimación sobre los posibles riesgos o complicaciones en el periodo postrasplante. En este estudio se demostró que la galectina-3 es tanto fisiopatológicamente como clínicamente relevante en cirrosis. La función exacta de la galectina-3 en el contexto de la enfermedad hepática crónica no se comprende aún por completo, sin embargo, se ha asociado como un posible indicador clínico de fibrosis hepática (85).

Con estos análisis se demuestra ahora niveles incrementados de galectina-3 en pacientes con cirrosis descompensada y ACLF en comparación con aquellos con cirrosis compensada. Esto se observó sistémicamente (niveles séricos) e intrahepáticamente tanto a nivel del ARN mensajero como de proteína (inmunohistoquímica). En pacientes que recibieron un trasplante hepático la galectina-3 sérica discriminó entre cirrosis avanzada y cirrosis compensada con un AUC= 0.84. Esta glicoproteína reflejó de manera precisa el estado de descompensación de los pacientes correlacionando significativamente con el score MELD-Na, la bilirrubina y el INR. Estas observaciones vinculan a la galectina-3 con la fisiopatología de la cirrosis avanzada y la progresión de la enfermedad hepática, siendo más expresada conforme la condición clínica del paciente empeora. Apoyando este hallazgo, los análisis de inmunohistoquímica presentados revelan que en cirrosis avanzada la expresión de galectina-3 se detectó principalmente en los hepatocitos y las reacciones ductulares. Considerando que la reacción ductular es un marcador histológico conocido asociado con la gravedad de la enfermedad y el estadio de fibrosis (114), la galectina-3 podría ayudar a identificar mejor aquellos con enfermedad más crítica.

Asimismo, la información presentada en este estudio resalta la relevancia de la galectina-3 en un mecanismo fisiopatológico adicional de la cirrosis avanzada, incluyendo la inflamación mediada inmunológicamente por el hígado y la disfunción inmunológica en general. Se conoce que los pacientes cirróticos cursan con perturbaciones inmunológicas importantes que comprenden por un lado una elevada inflamación sistémica y por el otro un marcado grado de inmunodeficiencia, lo que contribuye al desarrollo de falla multiorgánica y a un elevado riesgo de mortalidad asociado con la susceptibilidad a infecciones (30, 35, 115). De manera consistente con lo anterior, los pacientes con enfermedad hepática grave presentaron inflamación intrahepática activa mediada por una expresión significativamente mayor de IL-6, MCP-1, M-CSF y galectina-3 en comparación con pacientes compensados. La interleucina 8 (IL-8) es un quimioatrayente conocido de neutrófilos y aunque fue expresado significativamente más en el hígado de los pacientes con cirrosis avanzada, la expresión de los marcadores de neutrófilos CD66b y MPO no obtuvo significancia estadística. Por el contrario, los marcadores de infiltración macrofágica, MCP-1 y M-CSF, estuvieron elevados. Estos resultados concuerdan

con el estudio de Zimmermann y colaboradores en el que encontraron que IL-8 correlaciona con la fibrosis hepática y con el número de macrófagos hepáticos, pero no con la cuenta de neutrófilos. Lo anterior sugiere que la IL-8 podría estar involucrada en el reclutamiento y activación de macrófagos en el hígado con cirrosis (116), contribuyendo así al proceso inflamatorio.

En concordancia, se encontró una correlación importante entre la galectina-3 intrahepática y MCP-1, lo que es interesante ya que se ha reportado que niveles circulantes de este último funcionan como otro marcador relevante asociado con la gravedad de cirrosis y que su origen es principalmente en el hígado enfermo (117). La expresión de galectina-3 por ARNm no solamente correlacionó fuertemente con MCP-1, sino con todos los marcadores de inflamación analizados, lo que podría indicar que la galectina-3 se ve involucrada en la progresión y descompensación de cirrosis mediante mecanismos inflamatorios. Esto podría explicar por qué las correlaciones con parámetros de descompensación (MELD-Na, bilirrubina total y el INR) no tuvieron una fuerza de asociación alta como sí lo fue en el caso de las correlaciones con los parámetros inflamatorios. Igualmente podría ser una razón por la que se observaron niveles más altos de galectina-3 en pacientes con encefalopatía hepática y SIRS.

Se reconoce que el poder de discriminación de galectina-3 para distinguir entre cirrosis avanzada y cirrosis compensada en el punto de tiempo evaluado (al momento del trasplante) podría no ser clínicamente útil debido a que el paciente ya se encuentra recibiendo un trasplante hepático. Sin embargo, la intención general con estos análisis fue demostrar que los niveles de galectina-3 incrementan conforme progresa la enfermedad y que como tal esta glicoproteína tiene poder para identificar a los pacientes con la más elevada gravedad de la enfermedad. Con base en este importante vínculo fisiopatológico, la idea es extrapolar estos resultados y usar los niveles de galectina-3 para monitorizar a los pacientes con enfermedad hepática y así identificar aquellos en riesgo de progresión de manera temprana durante su curso clínico, o hacer una evaluación adecuada de la gravedad de la enfermedad para priorizar que el paciente reciba un trasplante hepático. De hecho, con los datos de la cohorte externa compuesta por pacientes con hepatitis alcohólica de los que se obtuvo una biopsia hepática al momento del diagnóstico, se pudo confirmar que los niveles de galectina-3 en efecto tienen el poder para discriminar la gravedad de la enfermedad. La galectina-3 tuvo excelente poder de discriminación entre hepatitis alcohólica temprana y grave con un AUC de 0.95, enfatizando que la medición de galectina-3 en un periodo más temprano durante el curso clínico del paciente puede ser clínicamente relevante para identificar una progresión de la enfermedad. Las correlaciones en estos pacientes entre galectina-3 y los marcadores inflamatorios fueron también elevadas, incluso con una  $r$  de 0.83, lo que coloca claramente a esta glicoproteína en la inflamación y la gravedad de la enfermedad observada en hepatitis alcohólica.

Por otro lado, la galectina-3 mostró ser también clínicamente relevante en el periodo postrasplante, donde niveles más altos predijeron complicaciones infecciosas. Al momento no hay un marcador clínico universalmente válido o score que pueda predecir este desenlace, aunque algunos reportes indican que un score MELD de 20 – 30 o  $\geq 30$  tiene asociación como factor de riesgo (111, 112). En este estudio la galectina-3 tuvo poder para discriminar de

manera general complicaciones infecciosas en el postrasplante con un AUC de 0.63. Se reconoce que este valor es relativamente bajo, pero incluso el AUC del MELD-Na también lo fue (0.65). No obstante, la galectina-3 mostró aún mayor poder (AUC= 0.89) en pacientes que ya se encontraban hospitalizados antes de ser sometidos a trasplante hepático debido a un evento de descompensación, mientras que el MELD-Na perdió su significancia estadística.

La utilidad de la medición de galectina-3 para determinar el riesgo de desarrollar infecciones en el periodo postrasplante se vio reforzada después de los modelos de riesgos proporcionales de Cox. Las razones de riesgo que se encontraron significativamente elevadas para galectina-3, la presencia de SIRS y el score MELD-Na sugieren la importancia de estas variables como factores de riesgo que deberían ser considerados en receptores de trasplante hepático. Como hallazgo relevante, se encontraron interacciones significativas entre estas tres variables, de manera que un paciente que presenta un nivel de galectina-3 arriba de 16.58 ng/mL, un score MELD-Na arriba de 20 y criterios de SIRS, tiene un riesgo para desarrollar complicaciones infecciosas en el postrasplante casi cinco veces más alto. De acuerdo con la importante modificación de efecto entre estas variables, esto podría haber explicado por qué un modelo de regresión multivariable no fue significativo. A pesar de que la evaluación pretrasplante de biomarcadores de inflamación sistémica, incluyendo la proteína C reactiva, ha sido asociada con la predicción de infecciones bacterianas durante el periodo postrasplante temprano (118), una implicación directa del SIRS en el desarrollo de complicaciones infecciosas en general no había sido reportada aún.

Considerando que el desenlace después de una cirugía mayor como es el trasplante hepático es difícil de predecir y las complicaciones infecciosas son una importante causa de morbilidad y mortalidad en los receptores de un injerto hepático, ocurriendo en más del 50% (119, 120), la galectina-3 podría tener valor pronóstico importante y potencial terapéutico. Las terapias inmunosupresoras incrementan la incidencia de infecciones oportunistas, sin embargo, muchos de los factores de riesgo en el pretrasplante siguen sin conocerse. De manera interesante, la galectina-3 sérica se encontró significativamente más alta en pacientes con cirrosis avanzada y este grupo fue el que presentó una mayor frecuencia de complicaciones infecciosas. Es importante considerar que esta glicoproteína tiene un papel inmunomodulador al ser conocido que regula las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas, pudiendo comprometer la adecuada defensa inmunológica del organismo al disminuir la diferenciación de las células dendríticas y su capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T (121). Adicionalmente, la galectina-3 es uno de los ligandos identificados del receptor de tirosina quinasa MER (MERTK), un receptor fagocítico cuya activación inhibe la respuesta proinflamatoria del sistema inmune innato (122, 123). Un estudio reciente encontró que los pacientes con ACLF tienen el mayor número de monocitos y macrófagos MERTK+, lo que correlacionó con la gravedad de la enfermedad y se asoció con una frecuencia más elevada de complicaciones infecciosas (124). Se demostró que los monocitos adquieren este fenotipo después de ser expuestos al ambiente inflamatorio sistémico, posiblemente al interactuar con ligandos de MERTK incluyendo la galectina-3, y de esta manera contribuyen a fenómenos como la parálisis inmunológica. Por lo tanto, en receptores de trasplante hepático un exceso de galectina-3 circulante debido a enfermedad avanzada podría alterar varios aspectos de la respuesta inmunológica, incluyendo

aquellos asociados con el reconocimiento de patógenos donde la galectina-3 ha mostrado tener un papel importante (121, 125). Esto podría ser perjudicial en el periodo inmediato del postrasplante, siendo un riesgo adicional a aquel que conlleva la terapia inmunosupresora.

En conjunto, se demuestra que la galectina-3 tiene el potencial para ser un indicador biológico pertinente de inflamación activa y gravedad de la enfermedad, que podría ser clínicamente útil solo o en combinación con otros scores para identificar a pacientes que tienen mayor urgencia de recibir un trasplante, incluyendo aquellos que podrían requerir una atención médica más intensiva después de ser sometidos a este procedimiento. La detección de niveles elevados de galectina-3 en el periodo pretrasplante podría justificar una administración más dirigida de antibióticos profilácticos. No obstante, la inhibición de la galectina-3 en pacientes que reciben un trasplante es también una alternativa que deberá ser explorada.

Concluyendo, la galectina-3 caracteriza a pacientes con un estado inflamatorio activo de cirrosis avanzada o enfermedad hepática grave y su expresión elevada tanto sistémica como intrahepática distinguió de manera precisa a pacientes con DC o ACLF de aquellos con CC al momento de recibir un trasplante hepático, así como a pacientes con AH grave de aquellos con AH temprana al momento del diagnóstico. De esta manera, la galectina-3 muestra utilidad como biomarcador para la detección de pacientes con enfermedad hepática en riesgo de progresión, sola o en combinación con ciertos scores. Adicionalmente, sus niveles fueron más altos en pacientes que desarrollaron complicaciones infecciosas en el postrasplante y tuvieron significancia como un predictor de este desenlace, adicional a la presencia de SIRS y un score MELD-Na alto. En consecuencia, el grado de expresión de la galectina-3 podría representar una característica particular de cada paciente con potencial pronóstico y terapéutico en receptores de un trasplante hepático.

#### 4.4 DISCUSIÓN: RESULTADOS GENERALES

Los resultados presentados previamente proceden de las observaciones y análisis que realicé durante el doctorado al enfocarme en los pacientes que reciben trasplante hepático ortotópico en el INCMNSZ y al identificar aquellos cuyo curso clínico es compatible con un diagnóstico de ACLF. En estas publicaciones resalté de manera importante que existe una población considerable de pacientes que desarrollan esta entidad y que logran ser trasplantados en el INCMNSZ, aunque también se puede encontrar una población prácticamente comparable de aquellos que no sobreviven hasta recibir un trasplante o que son excluidos del procedimiento y fallecen debido principalmente al estado avanzado de cirrosis o al desarrollo de infecciones. Al ver que la prevalencia de ACLF tan solo con la población de pacientes trasplantados fue de 38.9% en un periodo de 5 años se puede concluir que este Instituto Nacional de Salud concentra una gran cantidad de pacientes con enfermedad hepática crítica, considerando que la prevalencia de ACLF reportada en el estudio CANONIC fue de 33.4% en casi un año pero basada en los ingresos totales que obtuvieron 29 hospitales de Europa (27). Aprovechando la alta frecuencia de ACLF en el INCMNSZ, se pudo realizar un análisis completo sobre su curso clínico desde el evento inicial, logrando así contrastar entre los pacientes que pudieron beneficiarse de un trasplante hepático y aquellos que fueron excluidos o fallecieron en la lista de espera. Aún más importante, se encontró que la medición de galectina-3 tiene relevancia clínica en la enfermedad hepática al correlacionar con el grado de descompensación y también de inflamación intrahepática y mostrando adicionalmente poder para predecir complicaciones infecciosas en el periodo postrasplante.

Contrario a la hipótesis, la galectina-3 no fue distintiva exclusivamente de ACLF, pero en general caracterizó a los pacientes con un estado de cirrosis avanzada, o bien, pacientes con enfermedad descompensada con o sin fallas extrahepáticas. Sin embargo, una limitante a considerar es el hecho que la población analizada consistió en pacientes que recibieron trasplante hepático, por lo que se podrían esperar otros valores en aquellos que solo llegan a urgencias en estado crítico. En efecto, en análisis preliminares con muestras de suero de la población de pacientes con ACLF que no recibió un trasplante, parecen encontrarse niveles elevados cercanos o mayores a 100 ng/mL, lo que es parecido a lo reportado en pacientes con sepsis, choque séptico y/o traumatismo grave (126). Diferencias en la expresión de marcadores inflamatorios incluyendo galectina-3 se pueden esperar también entre ACLF y cirrosis descompensada considerando el curso clínico de cada uno de estos dos estadios, siendo aquel de ACLF de mayor gravedad dado el máximo grado de disfunción inmunológica asociada a cirrosis (35). Esto fue evidente después de una revisión exhaustiva de los expedientes de los pacientes trasplantados en el Instituto, donde a pesar de que la mayoría con ACLF no hubieran recibido dicho diagnóstico si solo se hubieran considerado los datos disponibles en el día del trasplante, más de la mitad presentó múltiples eventos de ACLF incluso varios meses antes del trasplante. De esta manera, estudios adicionales se encuentran justificados para valorar si fluctuaciones en la concentración de galectina-3 a lo largo del curso clínico de los pacientes se pudieran usar como un marcador independiente de progresión a estadios avanzados como ACLF, o en conjunto con scores estándares de pronóstico como el MELD-Na.

En este proyecto se propone también que una razón por la que la galectina-3 se encuentra elevada en pacientes con cirrosis avanzada es debido a su asociación con el estado inflamatorio. En efecto, no solo se demostró un elevado nivel de inflamación intrahepática, sino que la galectina-3 correlacionó positiva y significativamente con todos los marcadores inflamatorios e incluso se asoció con la presencia del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Esto puede ser de gran relevancia en la progresión a ACLF y su curso dinámico ya que podría ser uno de los mediadores que contribuyen a la disfunción y eventual falla de otros órganos, como ha sido expuesto en un estudio donde la galectina-3 inducida por lesión renal produjo activación del endotelio cardiaco con su consecuente disfunción y fibrosis al ser liberada a la circulación junto con citocinas proinflamatorias (127). En pacientes con lesión hepática incluyendo cirrosis esta glicoproteína podría ser también parte de los mediadores liberados y contribuir a la inmunopatología debido a su potencial participación en el fenómeno de parálisis inmunológica (124). Su elevada expresión intrahepática junto con aquella de citocinas proinflamatorias en pacientes con cirrosis avanzada podría servir de evidencia del *spillover* o desbordamiento inflamatorio hepático del que se ha hipotetizado (35). Será interesante conocer a qué grado esta lectina promueve o interviene en una respuesta inflamatoria exacerbada. Es posible que dado su papel como patrón molecular asociado a daño (70, 71) sea parte de los factores que originan aquellos eventos de descompensación cuyo precipitante no logra ser identificado. Asimismo, se podría considerar una participación más estrecha de la galectina-3 en el hígado ya que en estos análisis se demostró que tiene presencia intracelular en hepatocitos con cirrosis, sitio que es conocido también por la expresión del inflammasoma (128) cuya activación resulta ser una vía principal para la liberación de esta lectina (67).

De acuerdo con esta información, galectina-3 parece distinguir a pacientes con inflamación activa y por tanto aquellos con mayor urgencia de recibir un trasplante hepático. Esto se apoya en su poder para predecir infecciones en el postrasplante que fue aún mayor en pacientes que ya se encontraban hospitalizados antes de recibir un trasplante. Como se resaltó anteriormente, se podría haber esperado un AUC de mayor valor, sin embargo, incluso con las otras variables que tienen una relación fisiopatológica con este desenlace (el score MELD-Na y SIRS) no se encontró mayor poder e incluso reporté que había una importante modificación de efecto entre todas las tres variables. Esta observación enfatiza aún más la interrelación de la galectina-3 con los procesos infecciosos y la gravedad de la enfermedad hepática. Se requerirán estudios adicionales para determinar si la galectina-3 incrementa antes del inicio de un evento de descompensación, lo que corroboraría su papel fisiopatológico y reforzaría la utilidad de su medición para predecir, posiblemente de manera temprana, quiénes se encuentran en riesgo de progresar y por tanto deben recibir prioridad en la lista de espera. Considerando la observación de que los pacientes con ACLF pueden presentar múltiples eventos de descompensación antes de ser trasplantados, estaría asimismo justificada la valoración de fluctuaciones en la concentración de galectina-3 a lo largo del curso clínico del paciente para determinar beneficio o futilidad del trasplante junto con la valoración de los scores CLIF-C OF y CLIF-C ACLF, cuya utilidad se remarcó al valorar la gravedad de la ACLF entre pacientes trasplantados y no trasplantados.

En este ámbito es relevante considerar la necesidad de ampliar el estudio con una población mayor de pacientes y posiblemente de manera multicéntrica, en especial para poder determinar y validar el potencial uso de la galectina-3 como biomarcador teniendo como base estos análisis preliminares. Al momento, el haber encontrado niveles más altos de ARN en los pacientes con hepatitis alcohólica de la cohorte externa, cuya muestra se tomó al momento de ser diagnosticados, impulsa aún más el llevar a cabo estos estudios. La utilidad de esta lectina para distinguir a pacientes con cirrosis avanzada podría facilitar el reconocimiento de pacientes que requieren mayor vigilancia, por ejemplo, aquellos con ACLF que sobreviven un primer evento. Al estudiar el curso clínico de dichos pacientes fue evidente la propiedad dinámica de este diagnóstico, siendo notable el hecho que un poco más de la mitad en ambas poblaciones presentaron múltiples eventos de ACLF. De esta manera, un objetivo importante en la clínica debería ser impedir el desarrollo de eventos adicionales de descompensación ya que conllevan el riesgo de que el paciente se complique con fallas orgánicas adicionales, aumentando así su riesgo de mortalidad y las probabilidades de que ya no sea considerado como candidato para recibir un trasplante. Interessantemente, se pudo observar que la supervivencia postrasplante en los pacientes con ACLF es excelente (91.6% al año y 84.2% a los 6 años) aunque con una mayor frecuencia de infecciones en la estancia hospitalaria inmediata (49.5%), lo que confirma lo reportado en la literatura (40, 102, 106) y alentando la ejecución de más trasplantes en este extremo de la enfermedad. Asimismo, se puede suponer un riesgo considerable de desarrollar ACLF en el paciente con cirrosis que en múltiples ocasiones requiere atención médica debido a una descompensación. La galectina-3 podría ser el marcador ideal para llevar el seguimiento de estos y para determinar la posibilidad de que el paciente vuelva a presentar alguna complicación en el corto plazo. Logrando identificar dicho riesgo se podría llegar más rápido a una decisión de acelerar el proceso para enlistar y finalmente trasplantar al paciente, potencialmente reduciendo la mortalidad dentro de la lista de espera y evitando un trasplante fútil. Cabe notar que en estos análisis se encontró que la mortalidad de pacientes con ACLF elegibles al trasplante mientras esperaban poder ser intervenidos no fue despreciable (19.4%).

Conociendo su relevancia clínica sustentada en una alta expresión diferencial en el hígado y en la circulación de pacientes con cirrosis, así como en la literatura actual que apoya sus implicaciones en la fibrosis e inflamación hepática (76, 82, 129, 130), se deberá proceder también a entender mejor su papel dentro de los mecanismos de enfermedad de dicho órgano. Al comprender las posibles vías en las que interviene galectina-3, se podrá determinar mejor su potencial como blanco terapéutico. Al momento se ha reportado un ensayo clínico donde se probó el uso intravenoso de belapsectina con el objetivo de reducir la presión venosa hepática y fibrosis, sin encontrar una mejoría significativa excepto en un subgrupo de pacientes sin várices esofágicas (84). No obstante, debido a la diversidad de las funciones de esta glicoproteína cabe estudiar, por ejemplo, si al participar en el *splicing* del pre-ARNm influye en el sistema transcripcional hepático y en consecuencia en la función hepática. Asimismo, será interesante comprobar si sus implicaciones sobre el ciclo celular sean también relevantes en el hepatocito, lo que podría tener impacto en la capacidad regenerativa del hígado. Con este fin, se presentarán a continuación análisis preliminares que se llevaron a cabo adicionalmente con muestras de los pacientes trasplantados en el Instituto para ahondar en el conocimiento de la galectina-3 como molécula biológicamente importante en cirrosis.

## 5. RESULTADOS ADICIONALES

Presento a continuación los resultados del trabajo que empecé a la par con los artículos previamente detallados, procesando las mismas muestras analizadas de los pacientes con CC, DC y ACLF que recibieron trasplante hepático. Los siguientes análisis se llevaron a cabo con el fin de comprender posibles mecanismos patológicos en los que interviene galectina-3, alterando la función hepática y contribuyendo a la descompensación del paciente cirrótico. Con estos análisis destaco la importancia por un lado del sistema transcripcional hepático del cual previamente había reportado su relevancia en pacientes con falla hepática crónica (131), y por otro la expresión de marcadores del ciclo celular debido a su asociación con la progresión de la enfermedad (132) y con la senescencia hepática y pérdida de la capacidad regenerativa (133). Considerando las diversas funciones al momento reportadas sobre la galectina-3, es probable que participe también en la disfunción hepática tanto transcripcional como regenerativa, lo que incrementaría su utilidad clínica como biomarcador y posible blanco terapéutico.

### 5.1 LOS PRINCIPALES FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ENRIQUECIDOS EN EL HÍGADO SE ENCUENTRAN ALTERADOS EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE CIRROSIS Y CORRELACIONAN CON LA EXPRESIÓN INTRAHEPÁTICA DE GALECTINA-3

#### 5.1.1 En cirrosis, HNF4a es regulado a la baja mientras que HNF1a, CEBPa y FOXA2 al alta, encontrando correlaciones con parámetros de descompensación hepática

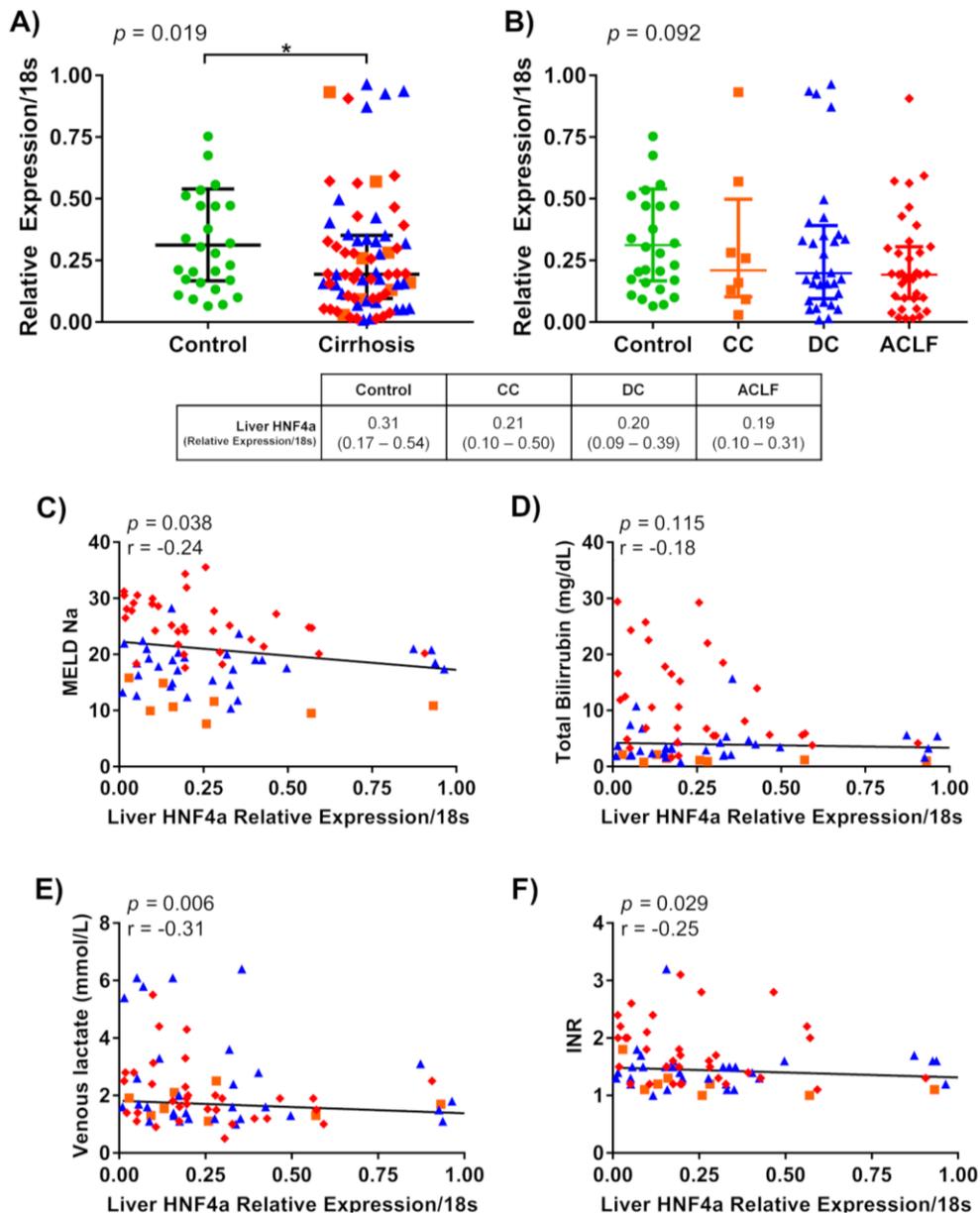
De acuerdo con análisis por qPCR de los principales factores de transcripción enriquecidos en el hígado se encontró que si bien no hubo diferencias significativas entre los diferentes estadios de cirrosis con respecto a la expresión del regulador maestro HNF4a ( $p= 0.092$ ), al comparar el grupo de cirrosis con el grupo control compuesto por las muestras de tejido hepático de los donadores, se encontraron niveles de expresión significativamente más bajos en los primeros ( $p= 0.019$ ) (**Figura 19 A-B**). Por el contrario, una regulación al alta se observó tanto con HNF1a ( $p= 0.032$ ) como con FOXA2 ( $p= 0.014$ ) y CEBPa ( $p= 0.012$ ) (**Figuras 20, 21, 22 A**). Solamente en el caso de FOXA2, el análisis de Kruskal-Wallis resultó significativo ( $p= 0.018$ ) aunque sin obtener pruebas de comparación múltiple con relevancia estadística. Tanto los pacientes con DC como aquellos con ACLF mostraron niveles de expresión de FOXA2 más altos que aquellos con CC o controles (**Figura 21B**).

Confirmando su importancia con la función hepática, se encontraron correlaciones entre los factores de transcripción enriquecidos en el hígado y parámetros clínicos que se evalúan en el paciente con cirrosis. HNF4a fue el único factor que mostró asociarse de manera significativa con el MELD-Na ( $r= -0.24$ ,  $p= 0.038$ ), mostrando además correlaciones con el lactato venoso ( $r= -0.31$ ,  $p= 0.006$ ) y con el INR ( $r= -0.25$ ,  $p= 0.029$ ) (**Figura 19 C-F**). CEBPa correlacionó significativamente con el INR ( $r= -0.26$ ,  $p= 0.048$ ) mientras que FOXA2 con el lactato venoso ( $r= -0.27$ ,  $p= 0.042$ ). HNF1a no alcanzó relevancia estadística, sin embargo, se puede ver una

tendencia con el sodio sérico ( $r = 0.20$ ,  $p = 0.092$ ) e INR ( $r = -0.23$ ,  $p = 0.054$ ). (**Figuras 20, 21, 22 C-F**)

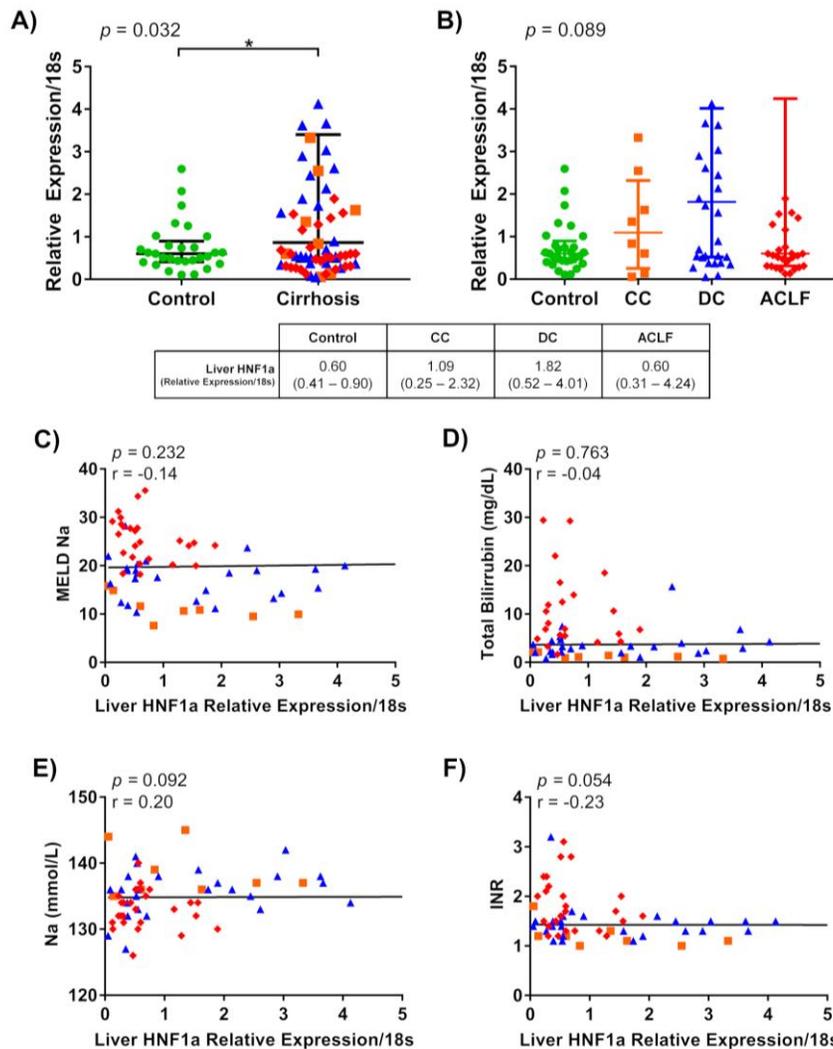
De manera interesante, HNF4a mostró ser específicamente relevante en el grupo de pacientes con ACLF al encontrar más correlaciones y con mayor poder estadístico en este subanálisis. Específicamente, HNF4a correlacionó fuertemente y de manera negativa con el MELD-Na ( $r = -0.46$ ,  $p = 0.005$ ), bilirrubina total ( $r = -0.38$ ,  $p = 0.025$ ) y lactato venoso ( $r = -0.38$ ,  $p = 0.026$ ), e incluso se observó que la disminución en la expresión intrahepática de HNF4a se asocia con una mayor expresión histológica de galectina-3 ( $r = -0.51$ ,  $p = 0.012$ ). (**Figura 23 A-D**)

**FIGURA 19**



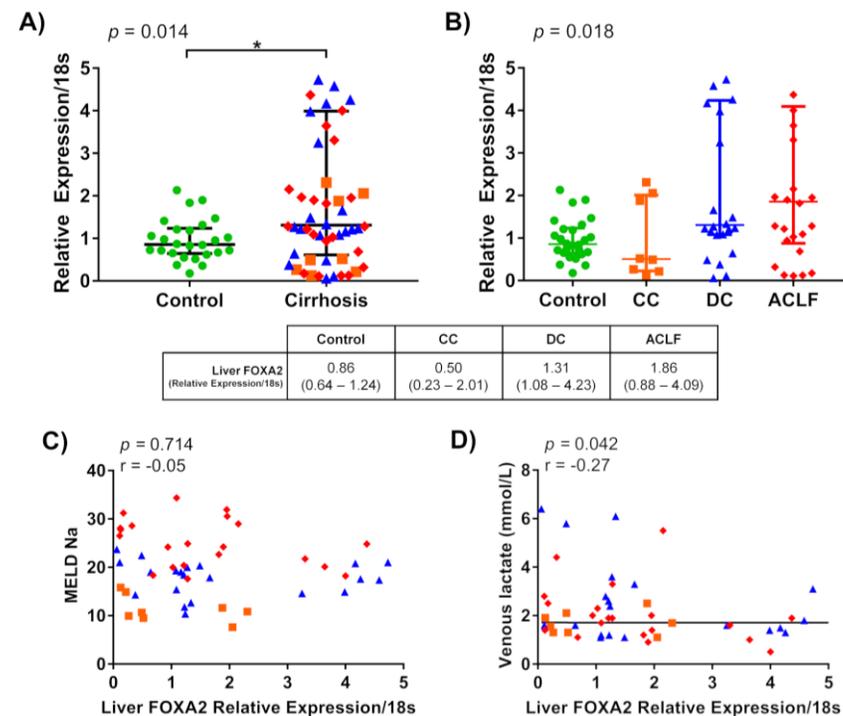
**Figura 19. Expresión hepática de HNF4a en cirrosis y correlaciones clínicas. A)** Niveles de expresión relativos de HNF4a entre controles y todos los pacientes con cirrosis (U de Mann-Whitney). **B)** Niveles de expresión relativos de HNF4a entre todos los grupos (las barras representan la percentila 25%, mediana y percentila 75%). Se realizaron pruebas de comparación múltiple con la prueba de Kruskal-Wallis. **C), D), E) y F)** correlaciones clínicas (coeficiente de Spearman). Controles (n=30); CC, cirrosis compensada (n=8); DC, cirrosis descompensada (n=32); ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (n=35); MELD-Na, *Model for End-Stage Liver Disease Sodium*; INR, *International Normalized Ratio*.

**FIGURA 20**



**Figuras 20, 21 y 22. Expresión hepática de HNF1a, FOXA2 y CEBPa en cirrosis y correlaciones clínicas. A)** Niveles de expresión relativos entre controles y todos los pacientes con cirrosis (U de Mann-Whitney). **B)** Niveles de expresión relativos entre todos los grupos (las barras representan la percentila 25%, mediana y percentila 75%). Se realizaron pruebas de comparación múltiple con la prueba de Kruskal-Wallis. **C), D), E)** y **F)** correlaciones clínicas (coeficiente de Spearman). Controles (n=30); CC, cirrosis compensada (n=8); DC, cirrosis descompensada (n=32); ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (n=35); MELD-Na, *Model for End-Stage Liver Disease Sodium*; INR, *International Normalized Ratio*.

**FIGURA 21**



**FIGURA 22**

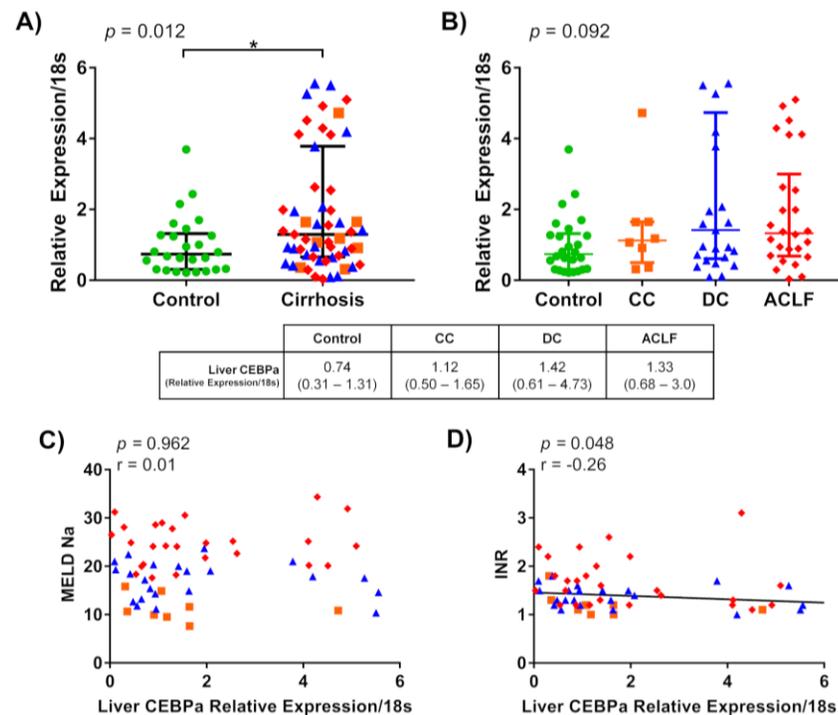


FIGURA 23

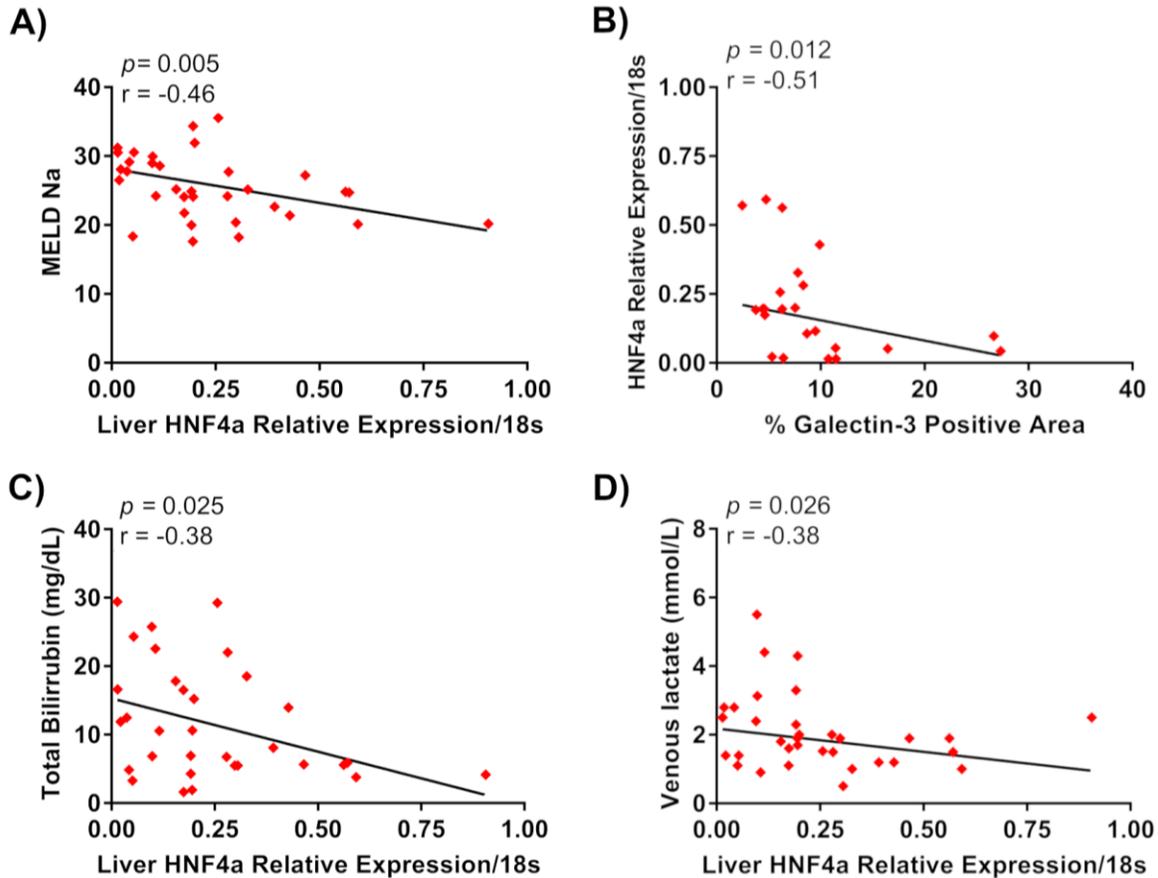
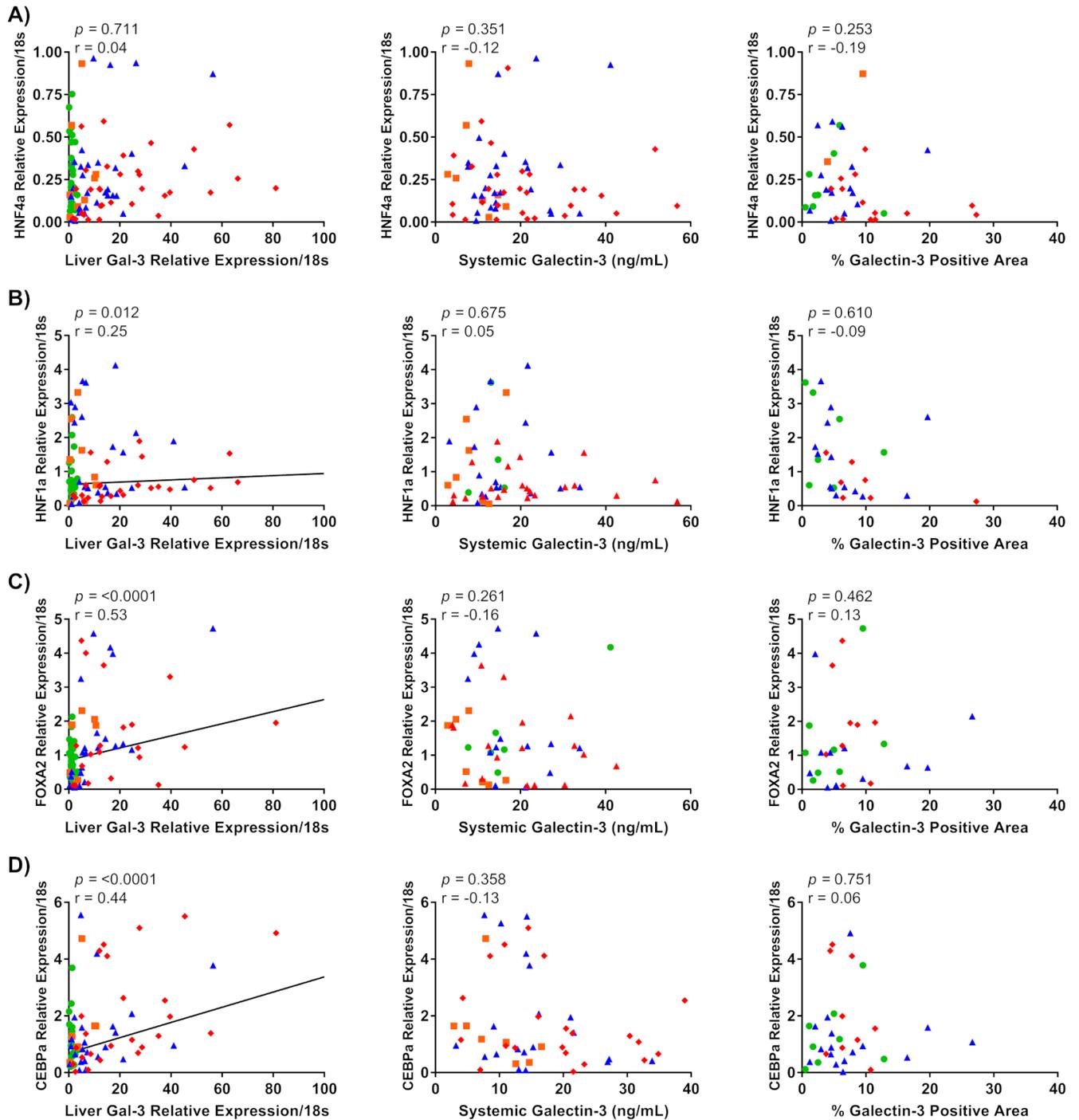


Figura 23. En ACLF una disminución en la expresión hepática de HNF4a se asocia con mayor expresión de galectina-3 y mayor gravedad de cirrosis. A) – D) correlaciones clínicas entre los niveles de expresión relativos de HNF4a en hígado de los pacientes con ACLF y parámetros de descompensación por cirrosis (coeficiente de Spearman). ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (n= 35); MELD-Na, *Model for End-Stage Liver Disease Sodium*.

### 5.1.2 Galectina-3 correlaciona intrahepáticamente con factores de transcripción enriquecidos en el hígado que se encuentran alterados en el paciente cirrótico

Se realizaron correlaciones entre los niveles de expresión de los factores de transcripción enriquecidos en el hígado de todos los pacientes analizados y la expresión de galectina-3 tanto en la circulación como en el hígado. Si bien no hubo asociación con HNF4a, se encontraron correlaciones positivas entre la expresión intrahepática de galectina-3 y HNF1a ( $r = 0.25$ ,  $p = 0.012$ ), FOXA2 ( $r = 0.53$ ,  $p < 0.0001$ ) y CEBPa ( $r = 0.44$ ,  $p < 0.0001$ ). Ninguna correlación fue significativa cuando se realizaron los análisis con la expresión en la circulación e histológica de galectina-3. (Figura 24 A-D)

## FIGURA 24



**Figura 24. La expresión intrahepática de galectina-3 se asocia con la de factores de transcripción alterados en cirrosis.** Análisis de correlación entre la expresión intrahepática, en la circulación e histológica (de izquierda a derecha) y la expresión intrahepática de los factores de transcripción enriquecidos en el hígado HNF4a **A)**, HNF1a **B)**, FOXA2 **C)** y CEBPa **D)** (coeficiente de Spearman). Controles (n=30); CC, cirrosis compensada (n=8); DC, cirrosis descompensada (n=32); ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (n=35).

## **5.2 MARCADORES DE LA PROGRESIÓN O ARRESTO DEL CICLO CELULAR EN EL HÍGADO SE ENCUENTRAN DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS DE ACUERDO CON EL ESTADIO DE CIRROSIS, REVELAN UN IMPORTANTE GRADO DE SENESCENCIA Y CORRELACIONAN CON LA EXPRESIÓN INTRAHEPÁTICA DE GALECTINA-3**

### **5.2.1 La expresión intrahepática de CCND1, Rb y p16 es mayor en pacientes con cirrosis y se asocia con el MELD-Na**

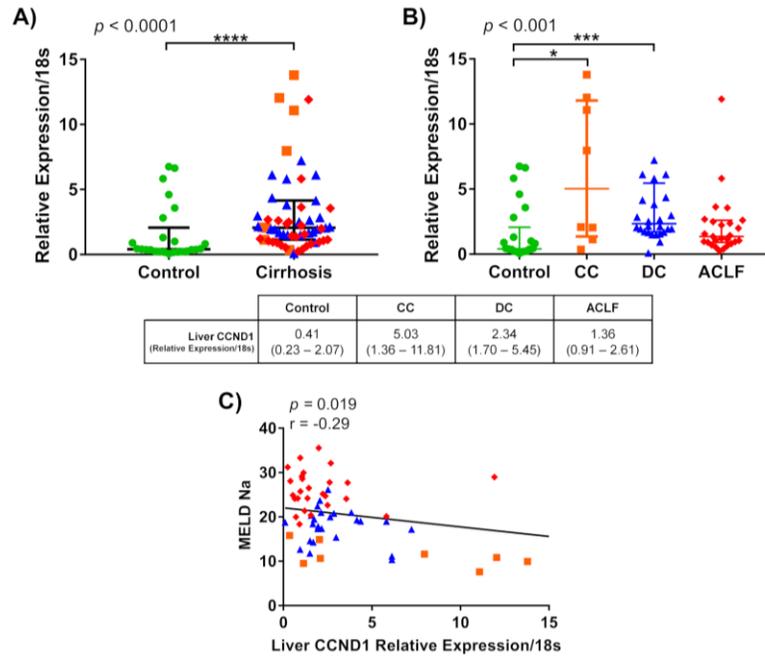
Continuando con los análisis de qPCR con las muestras de hígado de los pacientes con cirrosis al momento de recibir un trasplante, se midieron los niveles de expresión de la ciclina D (CCND1), ciclina B (CCNB1), Rb y p16 (Cdkn2a). Tanto con CCND1 como con Rb y p16 se observó una regulación al alta cuando se comparó la expresión de los pacientes con cirrosis con la de las muestras de los donadores control ( $p < 0.0001$ , cada uno). Los análisis de Kruskal-Wallis fueron igualmente significativos con estos marcadores encontrando, por un lado, después de análisis de comparación múltiple, que con CCND1 la diferencia entre controles y pacientes con CC y DC es estadísticamente significativo (controles 0.41 [0.23 – 2.07]; CC 5.03 [1.36 – 11.81]; y DC 2.34 [1.70 – 5.45];  $p < 0.001$ ). Se puede apreciar además que, si bien no hubo diferencias significativas entre los estadios de cirrosis, se observa un patrón donde numéricamente la expresión de CCND1 es mayor en CC, disminuyendo en DC y siendo la más baja en ACLF. Los resultados con Rb fueron similares a los de CCND1, encontrando una expresión significativamente más alta en CC y DC en comparación con controles (1.17 [0.37 – 2.33]; CC 8.40 [5.78 – 13.44]; y DC 6.86 [1.13 – 15.71];  $p < 0.001$ ). Por el otro lado, la expresión de p16 fue más alta en todos los estadios de cirrosis en comparación con los controles ( $p < 0.0001$ ), siendo mayor en pacientes con DC y ACLF (controles 7.95 [3.37 – 24.94]; CC 202.3 [12.43 – 665.7]; DC 279.4 [125.9 – 883.3]; y ACLF 274.5 [64.23 – 765.5]). Los análisis con CCNB1 mostraron que no hay diferencias significativas con los niveles de expresión entre controles y los estadios de cirrosis ( $p = 0.826$ ). (**Figuras 25, 26, 27, 28 A-B**)

Posteriormente, se investigó si estos marcadores se asocian con la gravedad de la enfermedad, es decir, con el score MELD-Na. En efecto, la mitad de los marcadores presentó una correlación significativa y negativa: CCND1 ( $r = -0.29$ ,  $p = 0.019$ ) y Rb ( $r = -0.38$ ,  $p = 0.002$ ). (**Figuras 25 y 27 C**).

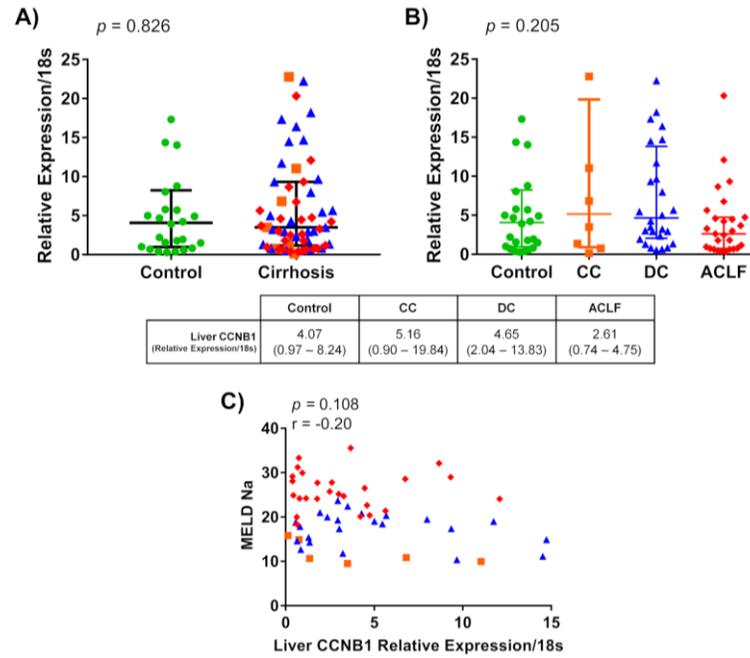
### **5.2.2 La expresión intrahepática de galectina-3 correlaciona fuertemente con el marcador de arresto celular p16**

Considerando todas las muestras procesadas, se procedió a analizar si galectina-3 en el hígado se asocia con los marcadores del ciclo celular estudiados. Con todos los marcadores se encontraron correlaciones moderadas a fuertes y positivas. Cabe destacar aquella con el inhibidor p16 que obtuvo una  $r = 0.73$  y  $p < 0.0001$ . Aquellas correlaciones con la galectina-3 en suero e histológica no tuvieron poder estadístico. (**Figura 29 A-D**)

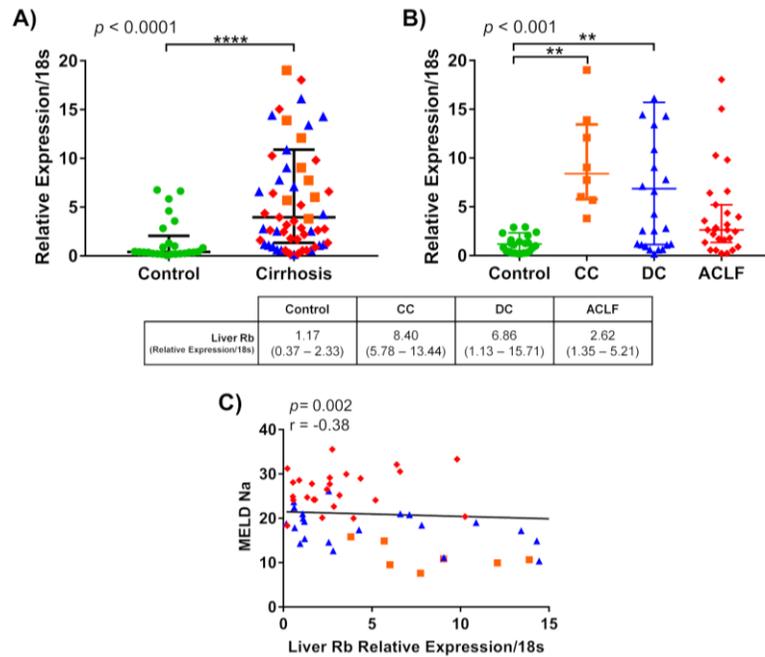
**FIGURA 25**



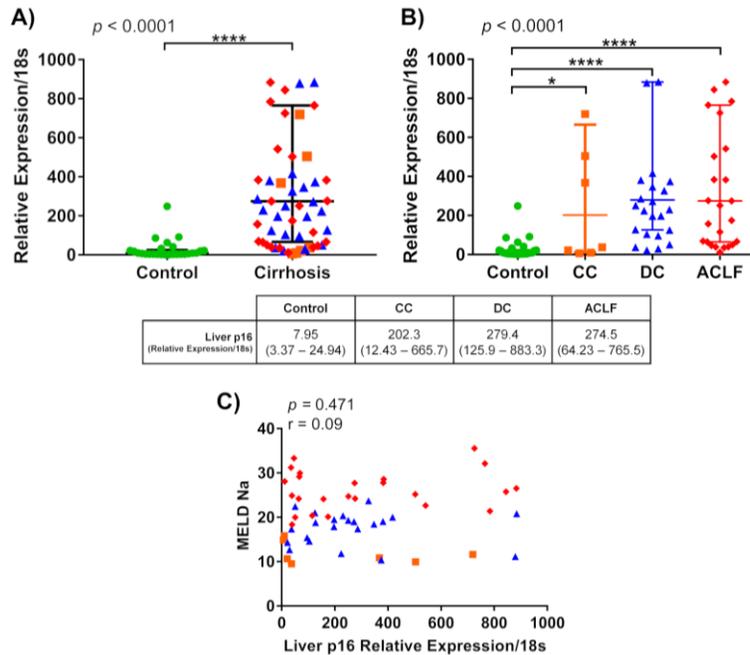
**FIGURA 26**



**FIGURA 27**



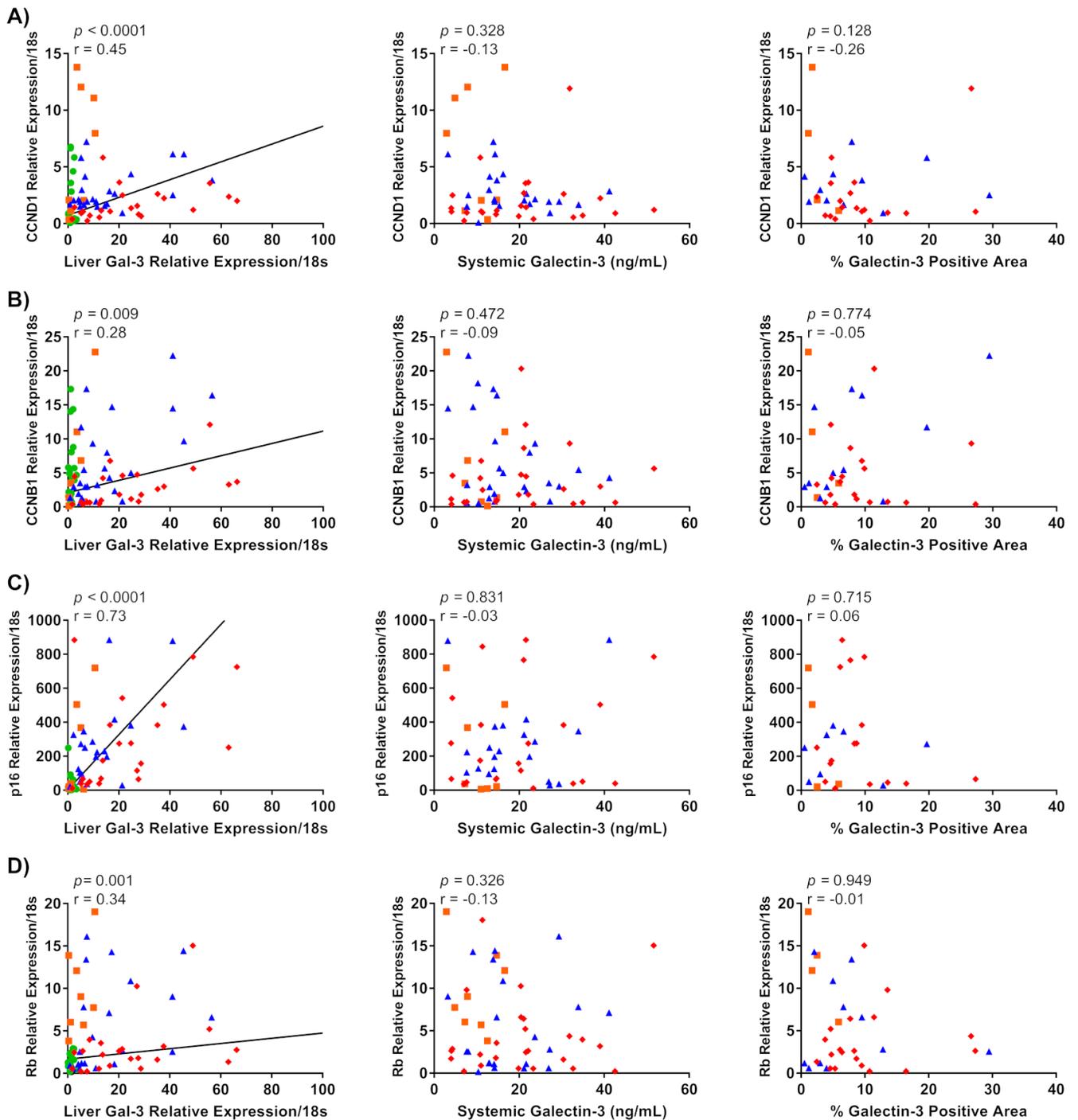
**FIGURA 28**



**Figuras 25, 26, 27 y 28. Expresión hepática de CCND1, CCNB1, Rb y p16, respectivamente, en los estadios de cirrosis.**

**A)** Niveles de expresión relativos entre controles y todos los pacientes con cirrosis (U de Mann-Whitney). **B)** Niveles de expresión relativos entre todos los grupos (las barras representan la percentila 25%, mediana y percentila 75%). Se realizaron pruebas de comparación múltiple con la prueba de Kruskal-Wallis. Se determinó también la correlación con el MELD-Na (coeficiente de Spearman). Controles (n=26); CC, cirrosis compensada (n=8); DC, cirrosis descompensada (n=28); ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (n=27); MELD-Na, *Model for End-Stage Liver Disease Sodium*; INR, *International Normalized Ratio*.

**FIGURA 29**

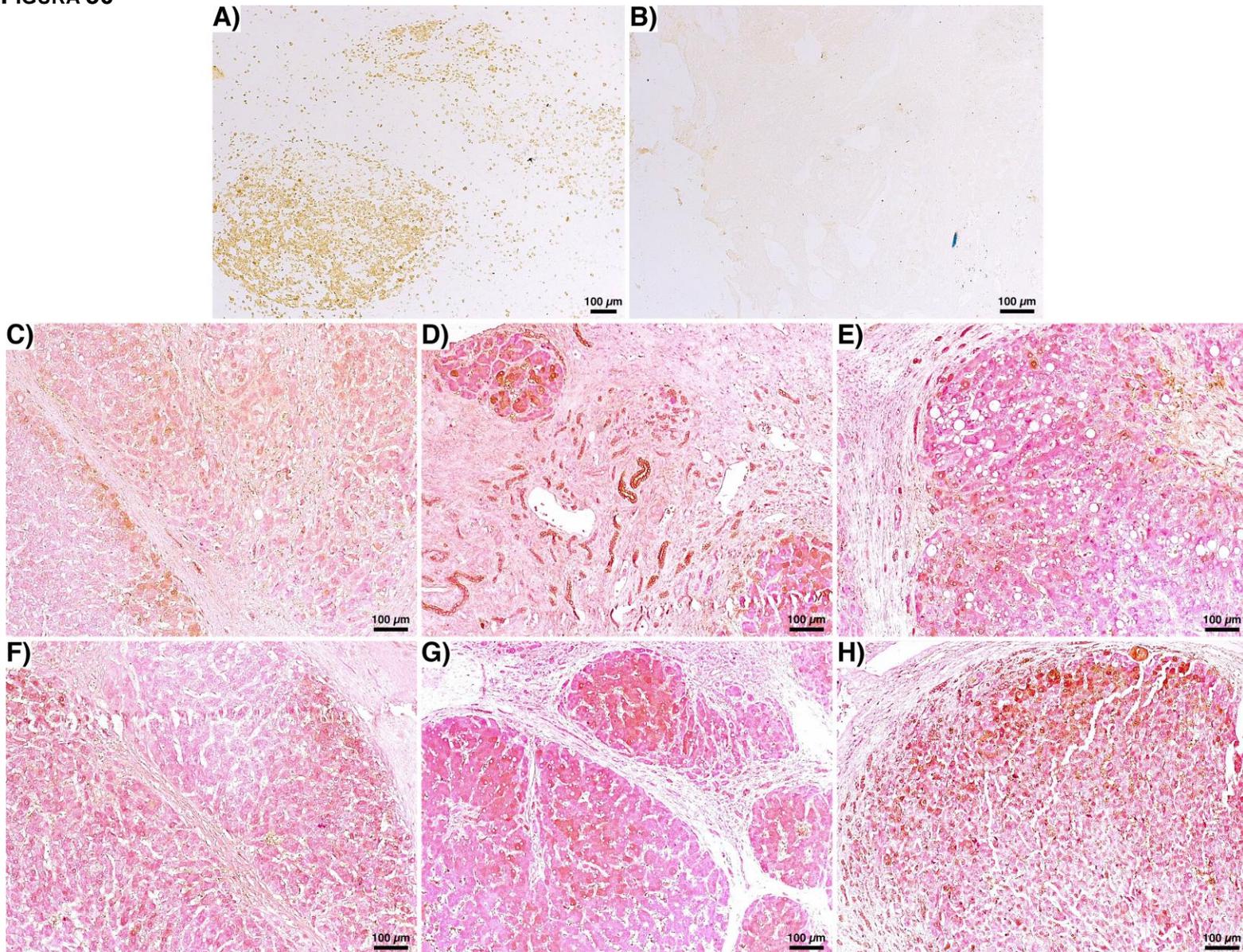


**Figura 29. La expresión intrahepática de galectina-3 se asocia con la de marcadores del ciclo celular alterados en cirrosis.** Análisis de correlación entre la expresión intrahepática, en la circulación e histológica (de izquierda a derecha) y la expresión intrahepática de los marcadores CCND1 **A)**, CCNB1 **B)**, p16 **C)** y Rb **D)** (coeficiente de Spearman). Controles (n=26); CC, cirrosis compensada (n=8); DC, cirrosis descompensada (n=28); ACLF, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (n=27).

### 5.2.3 La ausencia de Ki-67 y una alta expresión de los inhibidores p15/16 y p53 aunado a una doble positividad con galectina-3 caracterizan histológicamente al hígado cirrótico

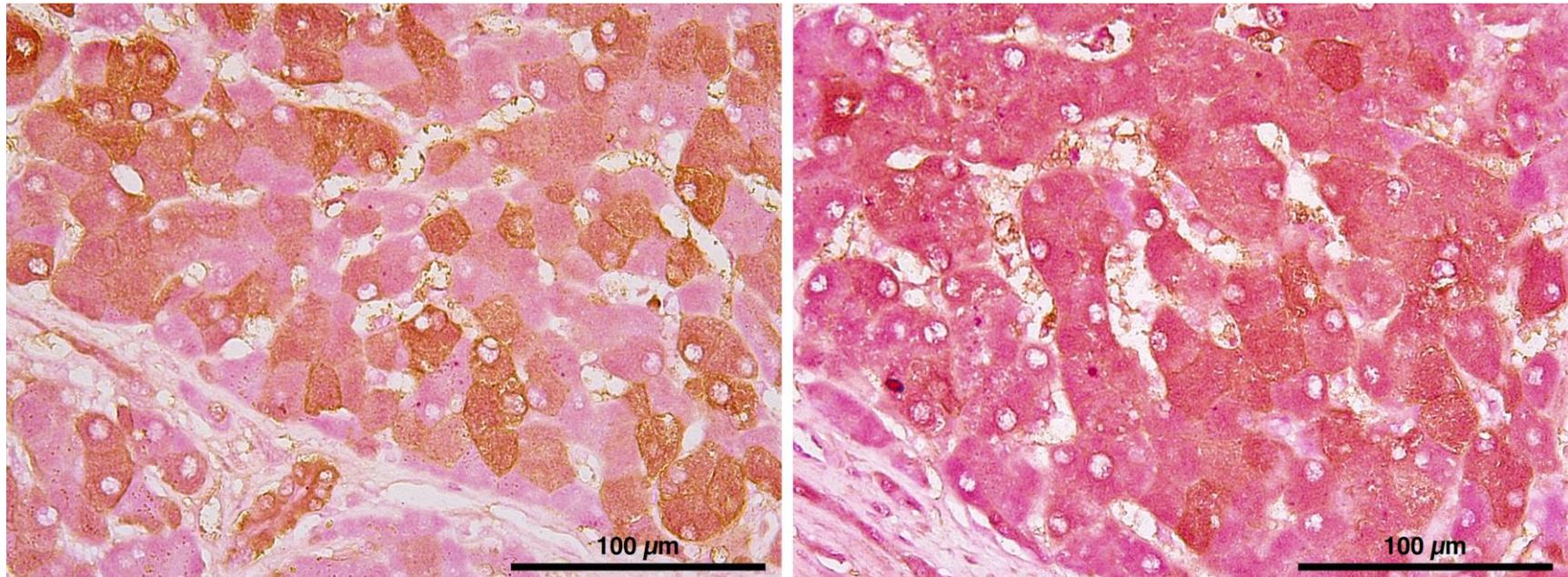
Procediendo al análisis histológico de marcadores del ciclo celular en secciones del tejido hepático de los pacientes, se decidió investigar la expresión de Ki67 como marcador de proliferación celular y de p15/16 y p53 como inhibidores en relación con la expresión de galectina-3. A diferencia de la marcada expresión de Ki67 en tejido control sano de amígdala (**Figura 30A**), en el hígado de pacientes con cirrosis se observó una ausencia completa de núcleos positivos independiente del estadio (**Figura 30B**). Por el contrario, una expresión difusa de p15/16 y p53 fue notable tanto en DC y ACLF como en aquellos con CC (**Figuras 30 C-E y G-H**, respectivamente), la cual se pudo localizar tanto en hepatocitos como en colangiocitos y macrófagos sinusoidales y de manera interesante tanto en el citoplasma como en el núcleo de los hepatocitos. De manera importante, en los tres estadios de cirrosis fue posible observar positividad doble (p15/16 o p53 + galectina-3) en los hepatocitos y en las reacciones ductulares. En pacientes con cirrosis avanzada (DC y ACLF) varios de aquellos hepatocitos que se distinguen por ser positivos a galectina-3 en la periferia de los nódulos de regeneración resultaron también visiblemente dobles positivos como se puede observar a mayor magnificación en la **Figura 31**, resaltando así la relevancia fisiopatológica de esta glicoproteína en los mecanismos de disfunción regenerativa.

FIGURA 30



**Figura 30. La ausencia de Ki-67 y una alta expresión de los inhibidores p15/16 y p53 aunado a una doble positividad con galectina-3 caracterizan histológicamente al hígado cirrótico. Todas las imágenes se muestran en magnificación total 100x. Se realizó inmunohistoquímica para Ki67 en tejido control sano de amígdala **A**) y en los pacientes con cirrosis **B**). Asimismo, en pacientes con cirrosis compensada (CC), cirrosis descompensada (DC) e insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF) se evaluó la expresión de p15/p16 (**C**), **D**) y **E**), respectivamente) y de p53 (**F**), **G**), y **H**), respectivamente). La señal positiva de p15/p16 o de p53 es color rosa, la de galectina-3 café, mientras que la doble positividad es marrón.**

**FIGURA 31**



**Figura 31. En cirrosis avanzada hepatocitos positivos a galectina-3 en la periferia de los nódulos de regeneración son también positivos a los inhibidores p15/p16 y p53. Las imágenes se muestran en magnificación total 400x. Aquella a la izquierda representa la inmunohistoquímica para los marcadores p15/p16 y galectina-3 mientras que la de la derecha los marcadores p53 y galectina-3. La señal positiva de p15/p16 o de p53 es color rosa, la de galectina-3 café, mientras que la doble positividad es marrón.**

### 5.3 DISCUSIÓN: RESULTADOS ADICIONALES

De manera reciente, gran interés se le ha otorgado a la determinación de las funciones de la galectina-3 como molécula fisiopatológicamente relevante. Su presencia ubicua en el organismo, así como su variada localización tanto extracelular como intracelular la hace una molécula fascinante y a la vez compleja con múltiples y potenciales aplicaciones clínicas. Conociendo mejor el papel de la galectina-3 en algún órgano en específico se podrá adquirir mayor conocimiento sobre su importancia en la enfermedad. En el hígado cirrótico falta aún por comprender las implicaciones de esta glicoproteína más allá de la fibrosis y la inflamación por lo que sabiendo que ha sido estudiada como factor asociado al proceso de *splicing* y en la regulación del ciclo celular, se propuso analizar en la misma cohorte de pacientes que recibieron trasplante hepático su posible intervención en la disfunción hepática mediada por irregularidades en la expresión de factores de transcripción enriquecidos en el hígado así como en la alterada regeneración hepática. Estos análisis preliminares demuestran asociaciones novedosas y considerables con galectina-3 en pacientes con diferentes estadios de cirrosis, lo que confirma la necesidad de profundizar en su relación molecular con los hepatocitos para así fundamentar su uso como biomarcador y blanco terapéutico.

A manera de afrontar la creciente prevalencia de pacientes con cirrosis descompensada y la falta de suficientes órganos trasplantables, será importante desarrollar estrategias innovadoras que permitan, por ejemplo, intervenir en la reversión de este estado de fibrosis. Bajo este objetivo, dos áreas de interés terapéutico a considerar son por un lado la alteración transcripcional y disfunción hepática y por el otro la disrupción del ciclo celular normal del hepatocito. En efecto, hemos demostrado que mediante análisis de expresión por ARNm el factor nuclear HNF4a destaca como un regulador maestro del sistema transcripcional hepático, al mostrar cambios significativos conforme mayor es la progresión de la enfermedad hepática crónica. En específico, pacientes con un Child-Pugh C se caracterizaron por tener los niveles de expresión más bajos, lo que se tradujo en una mayor descompensación clínica (131). Esto se apoyó en un estudio preliminar en el que se propuso la reprogramación del sistema transcripcional, encontrando de manera interesante que la transducción viral de HNF4a en un modelo de cirrosis en ratas logró revertir la falla hepática, restaurando fenotípicamente la población de hepatocitos lesionados (134). Se conoce también que una limitada capacidad regenerativa y aumento en la expresión de marcadores de senescencia correlacionan con la progresión de cirrosis, por lo que su mejoría va de la mano con aquella del estado de fibrosis (135). Una manera de intervenir en este fenómeno ha sido con el trasplante de células madre mesenquimales, lo que ha mostrado en un modelo murino lograr exitosamente una disminución en los inhibidores del ciclo celular p16, p21 y p27 con aumento del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y de la proteína antiapoptótica bcl-2 y a la vez una estabilización de la función hepática con disminución de la fibrosis (136).

No obstante, tanto la transducción viral como el trasplante de células mesenquimales representan terapias experimentales que aún faltan por ser perfeccionadas y en especial al ser aplicadas en humanos. El estudio de moléculas con relevancia fisiopatológica en estos mecanismos de enfermedad puede traer a luz blancos cuya inhibición o estimulación brinden

los posibles beneficios de estos dos métodos y a su vez sirvan como marcadores de progresión de la enfermedad y pronóstico. En este sentido, la lectina de unión a  $\beta$ -galactósidos conocida como galectina-3 es un gran candidato al tener apoyo en la literatura actual y más ahora con los análisis preliminares presentados. De manera interesante, la galectina-3 muestra tener también funciones esenciales a nivel nuclear, sitio donde son regulados el sistema transcripcional hepático y el ciclo celular. A pesar de carecer de una señal clara de localización nuclear, sus mecanismos de importación y exportación en este compartimento celular han sido bien documentados, en especial en relación con el cáncer y la progresión oncológica, aunque se reconoce que su secuencia contiene una presunta señal de exportación y que su fosforilación en la región N terminal o la eliminación de ciertos aminoácidos de su CRD influye en su movimiento hacia el citoplasma o al núcleo (137, 138). Una primera referencia de la galectina-3 nuclear fue su identificación como un componente que interactúa con las ribonucleoproteínas, lo cual fue seguido después por un estudio que confirmó su propiedad como un factor necesario para el *splicing* del pre ARNm (57, 139). Recientemente, ha sido asociada específicamente con la ribonucleoproteína hnRNPA2B1 y por análisis de secuenciación de ARN se sabe que la galectina-3 es importante en el *splicing* de genes involucrados en la regulación de la transcripción y traducción, metabolismo celular, transporte intracelular y la proliferación celular (140).

Su papel como regulador transcripcional es también conocido al ser demostrado que interactúa directamente y activa al factor TTF-1 expresado en el tejido tiroideo (141) y también que promueve las funciones de transactivación de los factores CREB y SP1 favoreciendo así la expresión de la ciclina D (58). Los resultados obtenidos en estos análisis adicionales plantean la posibilidad de que la galectina-3 se vea adicionalmente involucrada en mecanismos transcripcionales asociados con la disfunción hepática en cirrosis al encontrar correlaciones con los niveles de expresión relativos de HNF4a, HNF1a, CEBPa y FOXA2, los cuales son componentes esenciales del sistema de factores de transcripción enriquecidos en el hígado. Confirmando las observaciones anteriores, se observó que, si bien no hubo diferencias significativas entre los diferentes estadios de cirrosis, al comparar todos los pacientes con cirrosis contra los controles se identifican niveles más bajos de HNF4a en los primeros. De manera interesante, estos mismos análisis demuestran una mayor expresión de HNF1a, CEBPa y FOXA2 en cirrosis lo que podría estar relacionado con el complejo sistema de regulación cruzada que existe entre estos factores, por lo que una posibilidad es que en la enfermedad hepática estos se regulen al alta a manera de compensar la deficiencia de HNF4a. En este sentido se conoce, por ejemplo, que hay sitios de unión tanto para HNF1a como FOXA2 en el promotor de HNF4a en el hígado adulto y que CEBPa podría estar implicado en la activación del promotor de proteínas de la familia FOXA (142, 143). La importancia de HNF4a como regulador maestro de la función hepática se hace más evidente al ver que es el único factor que tuvo una asociación significativa con el MELD-Na y de manera más contundente en el grupo de ACLF donde alcanzó una  $r = -0.46$ , mostrando también una correlación negativa fuerte con la galectina-3 a nivel proteína por inmunohistoquímica ( $r = -0.51$ ). Estas observaciones consolidan la utilidad clínica de esta glicoproteína ya que su expresión varía a la par con aquella de los factores que directamente tienen una implicación en funciones esenciales para la homeostasis como son las del metabolismo y coagulación, lo que se

confirma con las correlaciones clínicas significativas con la bilirrubina, lactato y el INR. Además de poder servir como un marcador inmediato de la disfunción hepática se abre la posibilidad de que la galectina-3 interactúe con alguno de los HNFs, siendo así un blanco terapéutico de gran interés.

En el ciclo celular la participación de esta lectina ha sido más estudiada, aunque aún no es bien explicado si actúa como inhibidor o promotor ya que aparentemente es relativo al órgano en cuestión. Sin embargo, parece ser evidente su papel en la regulación al alta de la ciclina D, la cual ocurre en cooperación con una mayor expresión de la proteína Rb fosforilada, posiblemente mediante la estabilización de complejos de factores de transcripción. Este mismo mecanismo fue usado para explicar la inducción de ciclina A, p21 y p27 y la disminución de ciclina E observada en una línea de células epiteliales de mama, lo que podría conferir resistencia a la apoptosis (58, 144). En un reporte reciente se confirmó la importante y directa regulación de galectina-3 sobre el inhibidor del ciclo p21, encontrando que esta glicoproteína efectivamente hace un complejo con el factor de transcripción SP1 regulando así la expresión del gen de p21, lo que ayuda a mantener la quiescencia de las células madre hematopoyéticas y prevenir el agotamiento de esta población en la médula ósea (145). Resaltando la falta de unanimidad entre las distintas funciones de la galectina-3, estos datos contrastan con otro reporte en el que se señala que la expresión de esta lectina en el nicho de células progenitoras hepáticas es necesaria para su proliferación ante algún insulto al hígado, descubriendo por ejemplo que su bloqueo ocasiona una elevación del inhibidor p16 (86).

Los análisis preliminares que he llevado a cabo en las muestras de hígado cirrótico parecen favorecer la teoría sobre un arresto en el ciclo celular, demostrando niveles relativos de expresión más altos en todos los pacientes con cirrosis de CCND1, Rb, y p16 en comparación con las muestras control, sin haber diferencias significativas con CCNB1 el cual controla la transición G2/M. Galectina-3 correlacionó con todos estos marcadores pero resalta el análisis con p16 ( $r= 0.73$ ,  $p<0.0001$ ) y también aquel con ciclina D ( $r= 0.45$ ,  $p<0.0001$ ), lo que podría hablar sobre un intento regenerativo fútil del parénquima hepático al no poder pasar de la fase G1/S y completar así la mitosis. Asimismo, estos datos señalan el importante grado de senescencia que es inevitable con la falla hepática terminal de manera independiente a la edad del paciente, y que se caracteriza justamente por un arresto en la fase G1 del ciclo celular (133). Histológicamente se pudo constatar este fenómeno en las muestras de los pacientes, las cuales mostraron positividad a los marcadores p15, p16 y p53 mientras que Ki67 fue negativo indicando ausencia de proliferación. Estos análisis enseñan por primera vez que existe doble positividad con galectina-3, lo que incrementa su relevancia fisiopatológica como molécula asociada con la gravedad de la enfermedad. Apoyando estas observaciones, ha sido reportado también que el estrés y consecuente envejecimiento del nicho de células progenitoras en el hígado conlleva a la regulación al alta de la galectina-3, la cual puede ser incluso secretada por los mismos hepatocitos senescentes, y esta interactúa con las células progenitoras haciendo que pierdan la quiescencia y eventualmente agoten su potencial replicativo (146).

Por ende, se demuestra que la galectina-3 es una molécula con múltiples implicaciones en pacientes con cirrosis que van más allá de su propiedad como mediador inflamatorio. Los

resultados adicionales que aquí presenté apoyan el hecho que sus funciones nucleares son igualmente relevantes y que dadas las fuertes correlaciones que mantiene tanto con los factores de transcripción enriquecidos en el hígado como con los marcadores del ciclo celular que se encuentran patológicamente alterados, se justifican análisis adicionales para comprender posibles mecanismos de enfermedad y con esto fortalecer su uso clínico como biomarcador y blanco terapéutico. Como molécula que predice la gravedad de la enfermedad y posible pronóstico del paciente cirrótico, la galectina-3 muestra ahora tener un patrón de expresión que varía significativamente con aquel del regulador maestro de la función hepática, HNF4a, y con el de otros factores que podrían estar compensando sus niveles en un intento de preservar el equilibrio del sistema transcripcional de este órgano. Asimismo, se podrán validar algunas teorías vigentes en la literatura al observar que la expresión de galectina-3 tiene una evidente asociación con la senescencia hepática ante el insulto crónico y el arresto temprano del ciclo celular. En la terapéutica, la galectina-3 tiene además gran potencial al ser un blanco que fácilmente puede ser modificado con el uso de sustancias inocuas como la pectina. Si se consigue regularizar la expresión de los factores de transcripción del hígado o su capacidad regenerativa normal alterando los niveles de esta glicoproteína, podrá tener una ventaja adicional sobre terapias que aún no son seguras en humanos como la transfección viral o el trasplante de células madre. En definitiva, la galectina-3 requiere mayor estudio y es factible considerar aplicaciones adicionales a las que se presentan, considerando los resultados obtenidos al momento que revelan su relevancia fisiopatológica en pacientes con diferentes estadios de cirrosis.

## 6. LIMITACIONES, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Considerando las características metodológicas de este proyecto, cabe señalar la existencia de ciertas limitaciones. Los análisis se realizaron principalmente en torno a un grupo de pacientes que recibieron trasplante en un único centro, de manera que los hallazgos reportados deberán compararse con los de otros autores, especialmente tomando en cuenta que la demografía en el INCMNSZ puede variar con la de otros centros de trasplantes en México. Esto puede explicar, por ejemplo, la alta frecuencia que se encontró de pacientes con etiologías autoinmunes en comparación con la frecuencia más baja de VHC o hepatitis alcohólica. Con el fin de evitar un sesgo de selección al analizar el curso clínico de la ACLF y comprender mejor por qué ciertos pacientes con ACLF sí son sometidos a trasplante hepático, se analizó una población adicional de aquellos que a pesar de encontrarse enlistados para dicho procedimiento fueron excluidos o fallecieron antes de poder recibir un trasplante. Como fue descrito anteriormente, estos últimos mostraron una marcada progresión acelerada que se complicó con inestabilidad hemodinámica y falla multiorgánica, lo que inevitablemente conllevó a su fallecimiento. De esta manera, cabe enfatizar la importancia de agilizar el tiempo al trasplante ya que, aunque existen ciertos pacientes que no presentan una descompensación súbita, el hecho de presentar un evento adicional de ACLF trae un alto riesgo de presentar una nueva falla orgánica aunada a las ya existentes. Una propuesta en la que he trabajado como intento para facilitar la toma de decisiones y saber qué pacientes tienen mayor prioridad en la lista de espera es replantear la evaluación del grado de ACLF considerando, por ejemplo, el número total de fallas orgánicas que el paciente ha desarrollado desde que inició con este estadio de cirrosis. Posiblemente este podría ser un criterio adicional al score CLIF-C ACLF, aunque la medición de marcadores biológicamente relevantes en cirrosis como la galectina-3 podría aportar aún mayor poder para identificar aquellos con peor pronóstico a corto plazo.

Con los análisis en los que se determinó la asociación de la galectina-3 con la gravedad de la enfermedad y su utilidad en la evaluación pre- y postrasplante, se pudo analizar un grupo más pequeño de pacientes con cirrosis compensada debido a las características demográficas de los pacientes trasplantados en el Instituto y considerando que la indicación principal para que este grupo de pacientes estables reciban un trasplante es el hepatocarcinoma (HCC) secundario a infección por virus de hepatitis C. No obstante, una distinción clínica fue evidente entre aquellos con cirrosis compensada, descompensada y ACLF, como también se pudo mostrar por los diferentes niveles de galectina-3 presentes en estos estadios de enfermedad. En la literatura se ha mostrado que en el HCC prevalecen niveles altos de galectina-3, sin embargo, la gravedad y progresión de la enfermedad de los pacientes en estos reportes es ambigua (147, 148). Para determinar si el HCC podría influir en los niveles de galectina-3, se encontró que los niveles séricos e intrahepáticos de galectina-3 en los pacientes con DC que adicionalmente tenían HCC no fueron significativamente diferentes de aquellos de pacientes con DC sin HCC (16.39 ng/mL [IQR 11.16 – 23.85] vs. 14.08 ng/mL [IQR 10.61 – 24.84],  $p= 0.71$ ; y 14.83 [IQR 6.36 – 29.62] vs. 6.34 [IQR 3.67 – 27.35],  $p= 0.40$ , respectivamente). Un análisis con el grupo de pacientes con ACLF no fue posible ya que solo 2 de estos pacientes (3.3%) presentaban adicionalmente HCC. Considerando también que se pudieron observar patrones de expresión diferencial de galectina-3 aun cuando los pacientes con CC tenían HCC,

se puede concluir que la gravedad de la cirrosis es más relevante que la presencia de HCC en la expresión sistémica y hepática de galectina-3, como ya había sido sugerido en otro estudio (148).

Otra cuestión es que al tener una población con alta prevalencia de autoinmunidad existiera la posibilidad de que las mediciones de galectina-3 se vean influenciadas por la etiología. No obstante, después de comparar los niveles séricos e intrahepáticos de todos los pacientes con alguna etiología autoinmune contra los de aquellos que padecían infección por VHC (las dos etiologías principales del estudio), se encontró una diferencia significativa con los niveles séricos de galectina-3 (22.24 ng/mL [IQR 9.13 – 32.07] vs. 13.23 ng/mL [IQR 10.11 – 16.14], respectivamente), pero no con la galectina-3 intrahepática. Sin embargo, es importante mencionar que, con excepción de un solo paciente, aquellos que padecían alguna enfermedad autoinmune tuvieron DC o ACLF. De esta manera, dichos niveles elevados podrían ser resultado más bien de la gravedad de la enfermedad. En efecto, en la cohorte externa compuesta por pacientes con una etiología uniforme (hepatitis alcohólica, AH) la galectina-3 fue significativamente más elevada en aquellos con AH grave. Esto refuerza el hecho que la galectina-3 se sobre-expresa dependiendo de la gravedad de la enfermedad sin importar la etiología, lo que va en concordancia con lo reportado previamente en la literatura (85, 148, 149).

Por tanto, estos resultados dejan una base importante para esclarecer el curso clínico de los pacientes con la más alta gravedad de cirrosis y para justificar de manera más firme estudios que propongan a la galectina-3 como una molécula con gran potencial como biomarcador y blanco terapéutico en la enfermedad hepática. A pesar de que los análisis principales se realizaron con muestras procuradas al momento del trasplante, resultados similares se obtuvieron con los datos de la cohorte externa de AH cuya biopsia hepática se tomó al momento del diagnóstico. De esta manera el llevar a cabo mediciones tempranas de esta lectina en otros puntos de tiempo del curso clínico del paciente podría mantener utilidad clínica para estimar y monitorizar la gravedad.

Por el momento se han empezado análisis con algunas muestras de sangre de los pacientes que no pudieron ser sometidos a trasplante hepático con el fin de aseverar los resultados y poder proponer después mediciones seriadas de dicha glicoproteína que permitan ahondar directamente en su utilidad como biomarcador de progresión de la enfermedad hepática. De manera preliminar se cuenta con una muestra de suero que fue tomada antes del trasplante de 8 de los pacientes con ACLF que analicé como parte del grupo de pacientes trasplantados. Esta muestra se tomó con una mediana de tiempo de 25 días (IQR 12.0 – 109.8) antes de aquella medición al momento del trasplante. Se encontró que, aunque los niveles de la muestra basal son numéricamente más bajos que los de la muestra procurada en el trasplante, no hubo una diferencia estadísticamente significativa (17.75 ng/mL [IQR 14.13 – 45.84] vs. 22.71 ng/mL [IQR 8.94 – 60.07],  $p=0.84$ ). Cabe considerar que además del número limitado de pacientes analizados, el IQR del tiempo cuando se tomó aquella muestra basal (12.0 – 109.8) es muy grande. No obstante, parece ser que la galectina-3 incrementa conforme el tiempo y la enfermedad progresa. De hecho, dos pacientes mostraron progresión por coagulopatía y

disfunción renal lo que parece reflejarse en la elevación que se observó de galectina-3 de 14.82 a 68.46 ng/mL en uno de los pacientes y de 43.51 a 62.87 ng/mL en el otro. La medición seriada de galectina-3 también ya fue explorado por nuestro equipo en una cohorte de pacientes que padecieron COVID-19 en el Instituto encontrando, por ejemplo, una gran utilidad para la predicción de desenlaces adversos y en especial si se mide junto con parámetros clínicos convencionales de inflamación (150). De esta manera, es claro también que la relevancia patológica de esta molécula puede extenderse para la evaluación y seguimiento de otras condiciones no necesariamente hepáticas, especialmente si implican un proceso de inflamación y agudización importante.

Como se apoya en los análisis reportados, galectina-3 parece ser una molécula idónea que podría agregarse a scores estándares, pudiendo compensar irregularidades como por ejemplo el hecho que las mujeres al tener niveles de creatinina más bajos que los hombres se vean desfavorecidas al ser evaluadas con el MELD-Na, o que scores dirigidos al postrasplante carezcan de un factor que logre reflejar el grado de descompensación hepática. De hecho, al comparar los niveles séricos de galectina-3 de todas las mujeres y hombres analizados, se encuentra que las mujeres presentan niveles más altos que los hombres (20.39 ng/mL [IQR 11.30 – 28.94] vs. 14.19 [IQR 7.72 – 22.19], respectivamente;  $p= 0.03$ ), y en específico esta diferencia solo se mantiene en el grupo de aquellos con ACLF, de manera que la integración de galectina-3 a scores estándares pudiera ser de gran utilidad equilibrando disparidades en los pacientes más críticos y mejorando así la asignación de los injertos hepáticos. Como blanco terapéutico, este proyecto muestra la relevancia de la galectina-3 en cirrosis avanzada como una molécula asociada con el proceso inflamatorio intrahepático y además con la disfunción regenerativa y de los factores de transcripción hepáticos. Dependiendo de lo que se observe con estudios mecanísticos, la inhibición de galectina-3 con polisacáridos como la belaepectina podría contribuir con una disminución del grado de fibrosis y con un aumento en la regeneración hepática, todo lo cual se vería reflejado en mejor funcionalidad y en un microambiente de menor inflamación. Aunque en modelos murinos su utilidad terapéutica ya ha sido comprobada (80, 83), aún continúa en proceso un ensayo clínico en humanos el cual contempla también que la inhibición de galectina-3 sea benéfica, en parte debido a que el tratamiento con belaepectina es inocuo por su origen vegetal (84).

## 7. OTROS MANUSCRITOS

A lo largo del doctorado hemos logrado publicar los siguientes manuscritos, los cuales reflejan nuestro interés por contribuir al conocimiento tanto de la galectina-3 como de la ACLF y en general de la patología hepática. Resaltando la utilidad clínica de dicha glicoproteína como potencial biomarcador, tuve la oportunidad de organizar y participar en un proyecto donde extendimos su estudio a la estimación del pronóstico de pacientes con infección por SARS-CoV-2, sabiendo su patrón en pacientes con cirrosis avanzada y aprovechando la situación al momento ante la crisis por COVID-19. Sin duda, estas áreas de investigación son fascinantes y de gran aplicación médica, faltando aún mucho que explorar en especial en relación con el papel de la galectina-3 como molécula fisiopatológicamente relevante en el hígado.

### Glosario de abreviaciones:

**ACLF**, insuficiencia hepática aguda sobre crónica. **AH**, hepatitis alcohólica. **ARDS**, síndrome de dificultad respiratoria aguda. **AUC**, área bajo la curva. **COVID-19**, enfermedad por coronavirus 2019. **CRP**, proteína C reactiva. **EASL-CLIF**, *European Association for the Study of the Liver-Chronic liver failure*. **ELISA**, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas. **IMV**, ventilación mecánica invasiva. **MELD-Na**, *Model for End-Stage Liver Disease-sodium*. **NLR**, razón neutrófilos a linfocitos. **PCR**, reacción en cadena de la polimerasa. **RNAseq**, secuenciación de ARN. **ROC**, *receiver operating characteristic curve*. **SARS-CoV-2**, coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave. **SIRS**, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

- **Cervantes-Alvarez E**, Limon-de la Rosa N, Vilatoba M, Pérez-Monter C, Hurtado-Gomez S, et al. Galectin-3 is overexpressed in advanced cirrhosis and predicts post-liver transplant infectious complications. *Liver International*. 2022; 42(10):2260-73. <https://doi.org/10.1111/liv.15326>

Los pacientes con cirrosis avanzada presentan con frecuencia disfunción inmunológica y son más susceptibles a infecciones. La galectina-3 es una lectina de unión a  $\beta$ -galactósidos implicada en la inflamación, la regulación inmunológica y la fibrosis hepática. El objetivo de este estudio fue investigar la expresión de galectina-3 en cirrosis avanzada y su habilidad para predecir complicaciones infecciosas en el periodo postrasplante. Se recolectó suero y muestras de hígado de 129 pacientes con cirrosis al momento de recibir un trasplante hepático y de una cohorte externa de 37 pacientes con enfermedad hepática alcohólica incluyendo hepatitis alcohólica (AH) al momento del diagnóstico. La galectina-3 se analizó por ELISA, PCR tiempo real, inmunohistoquímica y RNA-seq. Se realizaron curvas ROC y análisis de riesgos proporcionales de Cox para evaluar el poder predictivo de la galectina-3 para gravedad de la enfermedad e infecciones en el periodo postrasplante. Como parte de los resultados se encontró que los niveles de galectina-3 fueron elevados en aquellos con cirrosis avanzada. La galectina-3 correlacionó significativamente con parámetros de la gravedad de la enfermedad y con marcadores inflamatorios. La galectina-3 tuvo poder significativo para discriminar entre cirrosis compensada y avanzada (AUC = 0.78/0.84,

galectina-3 circulante/hepática;  $p < .01$ ) y fue aún mayor para discriminar AH grave (AUC = 0.95,  $p < .0001$ ). Mediante un modelo de riesgos proporcionales de Cox se demostró que la galectina-3, el MELD-Na y la presencia del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) predicen el desarrollo de infecciones en el periodo postrasplante. Los pacientes con un nivel de galectina-3 sistémico  $>16.58$  ng/ml tenían un riesgo 2.19 veces 95% CI (1.12-4.29) incrementado, pero cuando se combina con un MELD-Na  $> 20.0$  y SIRS, el riesgo de desarrollar complicaciones infecciosas en el postrasplante incrementó a 4.6, 95% CI (2.38-8.90). En conclusión la galectina-3 es un marcador biológico novedoso de inflamación activa y gravedad de la enfermedad que podría ser clínicamente útil solo o en combinación con otros scores para identificar pacientes con cirrosis avanzada y predecir complicaciones infecciosas durante el periodo postrasplante.

- **Cervantes-Alvarez E**, Vilatoba M, Limon-de la Rosa N, Mendez-Guerrero O, Kershenobich D, Torre A, Navarro-Alvarez N. Liver transplantation is beneficial regardless of cirrhosis stage or acute-on-chronic liver failure grade: A single-center experience. *World J Gastroenterol*. Forthcoming 2022

El trasplante hepático como medida terapéutica en los pacientes con mayor gravedad de la enfermedad continúa siendo un tema controversial, a pesar de ser actualmente la única opción curativa. El objetivo de este estudio fue evaluar los desenlaces durante el periodo inmediato del postrasplante y comparar la supervivencia postrasplante a corto (1 año) y largo plazo (6 años) entre pacientes cirróticos estratificados por gravedad de la enfermedad. Incluimos pacientes cirróticos sometidos a trasplante hepático entre el 2015 y 2019 y los categorizamos en cirrosis compensada (CC), cirrosis descompensada (DC) e insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF). ACLF se subdividió adicionalmente de acuerdo con la gravedad en los grados ACLF-1, ACLF-2 y ACLF-3. Los desenlaces primarios de interés fueron el número total de días en la unidad de terapia intensiva (ICU) y en piso, el desarrollo de complicaciones y la supervivencia postrasplante al año y a los 6 años. 235 pacientes recibieron trasplante hepático (CC= 11, DC= 129 y ACLF= 95). Aquellos con ACLF tuvieron una estancia significativamente más prolongada en piso (8.0 [6.0-13.0] vs. CC, 6.0 [3.0-7.0], y DC 7.0 [4.5-10.0];  $p= 0.01$ ) y desarrollaron más complicaciones infecciosas (47 [49.5%], vs. CC, 1 [9.1%] y DC, 38 [29.5%];  $p < 0.01$ ). La supervivencia postrasplante al año y a los 6 años fue similar entre grupos ( $p= 0.60$  y  $p= 0.90$ , respectivamente). Los pacientes con ACLF subdivididos de acuerdo con el grado de ACLF (ACLF-1  $n= 40$  [42.1%], ACLF-2  $n= 33$  [34.7%] y ACLF-3  $n= 22$  [23.2%]) mostraron tener una duración similar en la UCI y en piso ( $p= 0.68$ ,  $p= 0.54$ ), así como también frecuencias comparables de complicaciones en general y aquellas de tipo infeccioso ( $p= 0.58$ ,  $p= 0.80$ ). No se encontró una diferencia en la supervivencia de los diferentes grados de ACLF al año y a los 6 años ( $p= 0.40$  y  $p= 0.15$ ). Se concluye que los pacientes se pueden beneficiar del trasplante hepático sin importar el estadio de cirrosis. Los pacientes con ACLF tuvieron una estancia en piso más prolongada y una mayor frecuencia de complicaciones infecciosas. No obstante, su supervivencia al año y a los 6

años es excelente y similar a la de los demás pacientes, lo que apoya seguir enlistando y trasplantando a todo aquel con ACLF incluyendo aquellos con ACLF-3.

- **Cervantes-Alvarez E \***, Limon-de la Rosa N \*, la Mora MS, Valdez-Sandoval P, Palacios-Jimenez M, et al. Galectin-3 as a potential prognostic biomarker of severe COVID-19 in SARS-CoV-2 infected patients. *Scientific reports*. 2022; 12(1):1856. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05968-4>. \*Contribuyeron igual

La COVID-19 grave se encuentra asociada con una respuesta sistémica hiperinflamatoria que conlleva al síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), falla multiorgánica y defunción. La galectina-3 es una lectina de unión a  $\beta$ -galactósidos que se conoce por promover el reclutamiento de neutrófilos y la liberación de citocinas proinflamatorias, contribuyendo así a la inflamación de la vía aérea. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar el potencial de la galectina-3 como un biomarcador de desenlaces graves por COVID-19. Se incluyeron prospectivamente 156 pacientes con COVID-19 confirmados por PCR tiempo real. Un desenlace grave se definió como el requerimiento de ventilación mecánica invasiva (IMV) y/o defunción intrahospitalaria. Se consideró como desenlace no grave el alta hospitalaria sin requerimiento de IMV. Se utilizaron curvas ROC y análisis de regresión logística multivariable para determinar el poder de la galectina-3 sérica para predecir desenlaces graves. Los niveles de galectina-3 discriminaron bien entre desenlaces graves y no graves y correlacionaron con marcadores de gravedad de la enfermedad por COVID-19 (la proteína C reactiva [CRP], la razón neutrófilos a linfocitos, el dímero-D, y la cuenta de neutrófilos). Mediante un análisis de regresión logística por pasos se identificó que la galectina-3 es un predictor independiente de desenlace grave (razón de momios 3.68 [95% CI 1.47–9.20],  $p < 0.01$ ). Adicionalmente, la galectina-3 en combinación con la CRP, la albúmina y una afectación pulmonar  $>50\%$  muestra una mejor habilidad para predecir desenlaces graves (AUC 0.85 [95% CI 0.79–0.91],  $p < 0.0001$ ). Con base en la evidencia de este estudio, se recomienda que los médicos midan los niveles de galectina-3 al ingreso hospitalario para facilitar la asignación oportuna de los recursos adecuados a los pacientes con COVID-19 que se encuentran en mayor riesgo de desarrollar un desenlace grave.

- Limon-de la Rosa N \*, **Cervantes-Alvarez E \***, Mendez-Guerrero O, Gutierrez-Gallardo MA, Kershenobich D, Navarro-Alvarez N. Time-Dependent Changes of Laboratory Parameters as Independent Predictors of All-Cause Mortality in COVID-19 Patients . *Biology*. 2022; 11(4), 580. <https://doi.org/10.3390/biology11040580>. \*Contribuyeron igual

Se han identificado predictores independientes de mortalidad para pacientes con COVID-19 al momento de ser ingresados al hospital. Sin embargo, se desconoce cómo estos se comportan durante la hospitalización. El objetivo de este estudio fue identificar parámetros clínicos y de laboratorio desde el ingreso hasta el alta hospitalaria que distingan entre sobrevivientes y no sobrevivientes de COVID-19, incluyendo aquellos con poder independiente para predecir mortalidad. En una cohorte de 266 pacientes adultos, datos

clínicos y de laboratorio fueron analizados desde el ingreso y a lo largo de la estancia hospitalaria hasta el alta o la defunción del paciente. Al ingreso, aquellos que fallecieron tuvieron una elevación significativa de la proteína C reactiva (CRP), la cuenta de neutrófilos, la razón neutrófilos a linfocitos (NLR) [ $p < 0.0001$  cada uno de estos], la ferritina [ $p < 0.001$ ], y la aspartato aminotransferasa [ $p = 0.009$ ] en comparación con los sobrevivientes. Durante la estancia hospitalaria, los pacientes que fallecieron mantuvieron una CRP elevada (21.7 mg/dL [ingreso] vs. 19.3 [hospitalización],  $p = 0.060$ ), así como valores altos de ferritina, cuenta de neutrófilos y la NLR. Por el contrario, los sobrevivientes mostraron reducciones significativas de la CRP (15.8 mg/dL [admisión] vs. 9.3 [hospitalización],  $p < 0.0001$ ), la ferritina, la cuenta de neutrófilos, y la NLR durante la estancia hospitalaria. Al ingreso, una CRP elevada, la ferritina y diabetes fueron predictores independientes de mortalidad, así como fueron una CRP persistentemente elevada, la neutrofilia y el requerimiento de ventilación mecánica invasiva durante la estancia hospitalaria. Los parámetros inflamatorios y clínicos que distinguieron entre los sobrevivientes y no sobrevivientes al ingreso cambiaron significativamente durante la estancia hospitalaria. Se encuentra justificada una evaluación más estrecha de estos marcadores para monitorizar y predecir el desenlace de los pacientes con COVID-19 una vez que se encuentran hospitalizados.

- Limon-de la Rosa N, **Cervantes-Alvarez E**, Navarro-Alvarez N. Increased Hepatic Expression of SARS-CoV-2 Entry Points and Proinflammatory Cytokines in Cirrhosis. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.08.053>

Se ha reportado recientemente que los pacientes con cirrosis tienen una mortalidad significativamente más alta después de la infección por SARS-CoV-2. Específicamente se ha demostrado que la mortalidad fue mayor en aquellos con cirrosis avanzada (Child-Pugh B y C) y que aproximadamente la mitad de los pacientes cirróticos infectados con este virus sufren una descompensación aguda incluyendo ACLF. Desafortunadamente, la presencia basal de descompensación hepática ha sido asociada como predictor independiente de mortalidad en pacientes con la enfermedad por coronavirus 2019. Los pacientes que contraen COVID-19 tienen peor pronóstico con una mortalidad general reportada mayor a 30%. Se cree que la producción elevada de citocinas y la endotoxemia presente en pacientes con cirrosis los lleva a una respuesta inflamatoria amplificada después de la infección y por tanto podría ponerlos en mayor riesgo de desenlaces adversos. De esta manera propusimos analizar la expresión hepática de ACE2, TMPRSS2, IL-6, IL-8, y MCP-1 en pacientes con cirrosis para proporcionar información sobre un mecanismo potencial que los predispone a COVID-19 grave y una mayor mortalidad.

- **Cervantes-Alvarez E** \*, Lizardo-Thiebaud MJ \*, Limon-de la Rosa N, Tejeda-Dominguez F, Palacios-Jimenez M, Mendez-Guerrero O, et al. Direct or Collateral Liver Damage in SARS-CoV-2-Infected Patients. *Seminars in liver disease*. 2020;40(3):321-30. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715108>. \*Contribuyeron igual

La infección por el SARS-CoV-2 puede resultar en lesión hepática, con más de un tercio de los pacientes con COVID-19 manifestando elevación de las enzimas hepáticas. La esteatosis microvesicular, inflamación, congestión vascular y trombosis han sido descritas en muestras de autopsias de pacientes con COVID-19. Varios factores incluyendo el efecto citopático directo del virus, daño colateral mediado por el sistema inmunológico, o la exacerbación de enfermedad hepática preexistente podrían contribuir a la patología de la COVID-19 en el hígado. Debido a sus implicaciones inmunológicas, el hígado es un órgano potencialmente involucrado en la respuesta viral contra el SARS-CoV-2, lo que lo podría predisponer a lesión. Se necesita un mejor entendimiento de los mecanismos que contribuyen al daño hepático para desarrollar e implementar medidas tempranas que permitan prevenir mayor deterioro en pacientes que padecen COVID-19. Esta revisión de la literatura resume reportes actuales sobre el SARS-CoV-2, enfatizando en cómo la infección directa y la respuesta inflamatoria subsecuente podrían contribuir a la lesión hepática en pacientes con y sin enfermedad hepática preexistente.

- Mendez-Guerrero O, Calle-Rodas DA, **Cervantes-Alvarez E**, Alatorre-Arenas E, Perez-Escobar J, Navarro-Alvarez N, et al. Renal and brain failure predict mortality of patients with acute-on-chronic liver failure admitted to the intensive care unit. *Annals of hepatology*. 2021;22:100270. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2020.09.014>.

La insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF) se caracteriza por fallas orgánicas y una elevada mortalidad a 28 días. El identificar predictores clínicos asociados con mortalidad temprana podría tener implicaciones en el tratamiento de pacientes con ACLF. En este estudio de cohorte prospectiva se incluyeron pacientes diagnosticados con falla hepática crónica que desarrollaron ACLF de acuerdo con la definición del consorcio EASL-CLIF y que fueron admitidos a la unidad de cuidados intensivos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán entre el 2012 y 2018. Se realizaron análisis de regresión de Cox de tipo bivariado y multivariado para identificar factores asociados con mortalidad. 148 pacientes (55% mujeres) fueron diagnosticados con ACLF de los cuales 55% (n= 82) tuvieron ACLF grado 3, 28% (n= 41) grado 2 y 17% (n= 25) grado 1. La mediana de edad fue de 54 años (41 – 63). La etiología más frecuente fue la infección por el virus de hepatitis C en 29.8% (n= 44) de los pacientes, siendo la infección bacteriana el factor precipitante predominante en un 58.1% (n= 86). La supervivencia acumulativa global a 90 días fue solo de 18%. Cuando se dividieron los pacientes por grado de ACLF, la supervivencia fue de 10% en aquellos con ACLF-3. Además, en un análisis de regresión de Cox multivariado, la falla renal (HR 3.26, 95% CI (2.13 – 4.99)), falla cerebral (HR 1.37, 95% CI 1.09 – 2.04) y el sexo masculino (HR 1.62, 95% CI 1.10 – 2.40) fueron predictores independientes de mortalidad a 28 y 90 días. Se concluye que la ACLF es un síndrome frecuente en pacientes con enfermedad hepática crónica. La falla cerebral y renal se asociaron significativamente con la mortalidad y son predictores independientes de mortalidad a 28 y 90 días.

- Lizardo-Thiebaud MJ, **Cervantes-Alvarez E**, Navarro-Alvarez N. Towards the Study of Liver Failure: Protocol for a 90% Extended Hepatectomy in Mice. In: Gayam V, Engin O, editors. Liver Pathology [book on the Internet]. IntechOpen; 2019. p. 1-19. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90245>.

La hepatectomía extendida se puede definir como la eliminación de más del 70% del volumen hepático. Estudios han demostrado que la hepatectomía extendida imita la falla hepática post-hepatectomía y podría ayudar también a comprender el síndrome denominado pequeño para el flujo (*small-for-flow syndrome*). A nivel molecular, parece haber un retraso en la entrada al ciclo celular por lo que ocurre disfunción hepática. Por lo tanto, se considera necesario estudiar los mecanismos de dicho fenómeno para así entender cómo podría ser regulado. Mientras que el modelo clásico de la hepatectomía al 70% usado para estudiar la regeneración hepática ha sido descrito previamente de manera extensa, no existen protocolos que describan el procedimiento quirúrgico para una hepatectomía extendida al 90%. Por lo tanto, describimos un protocolo detallado y reproducible que define los aspectos específicos que deben ser considerados, así como las complicaciones más comunes y estrategias para la resolución de problemas.

## 8. RECONOCIMIENTOS

El presente proyecto de doctorado se presentó en el taller de investigadores jóvenes durante el XVI congreso de la Asociación Mexicana de Hepatología, llevado a cabo en octubre del 2021, siendo elegido ganador. Asimismo, este trabajo fue seleccionado como póster distinguido durante el congreso de la American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) celebrado en noviembre 2021. Otras exhibiciones de los trabajos se realizaron también en el American Transplant Congress (ATC) en el 2020 y 2022, mientras que los primeros avances del proyecto fueron presentados durante la Semana Nacional de Gastroenterología organizada por la Asociación Mexicana de Gastroenterología en el 2019.



# Certificate of ATTENDANCE



Presented to:

**Eduardo Cervantes, Dr.**

for attendance at The Liver Meeting Digital Experience™ on November 12-15, 2021.

*The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) is accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME) to provide continuing medical education for physicians. AASLD takes responsibility for the content, quality and scientific integrity of this CME activity.*

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Matthew D'Uva".

**Matthew D'Uva, FASAE, CAE**  
Chief Executive Officer

*Please contact [education@asld.org](mailto:education@asld.org) with any questions about your participation in this activity.*



Otorga la presente

## CONSTANCIA

a

*E. Cervantes-Álvarez, F. Tejeda-Domínguez, E. Alatorre-Arenas,  
O. Méndez-Guerrero, S. Hurtado-Gómez, A. Torre, M. Vilatobá,  
D. Kershenobich, N. Navarro-Álvarez, "Grupo Colaborativo"*

*Por la presentación de su trabajo en Cartel*

*Galectina-3 como potencial biomarcador de severidad y pronóstico en cirrosis y  
ACLF.*

*En la Semana Nacional de Gastroenterología  
que se efectuó del 16 al 20 de noviembre*

*Cancún, Quintana Roo. México. 20 de noviembre de 2019.*

*Dr. Felipe Zamarripa Dorsey  
Presidente de la AMG*

*Dr. Mario Peñáz Luna  
Secretario de la AMG*

ID 173

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Tsung A, Geller DA. In: Monga SP, editor. *Molecular Pathology of Liver Diseases* Springer Science & Business Media; 2011. p. 3-6.
2. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of toxicology*. 2013;87(8):1315-530.
3. Ross MH, Pawlina W. *Liver, Gallbladder, and Pancreas. Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 7th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2016.
4. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371(9615):838-51.
5. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016;13(2):88-110.
6. Verbeke L, Nevens F, Laleman W. Bench-to-beside review: acute-on-chronic liver failure - linking the gut, liver and systemic circulation. *Critical care*. 2011;15(5):233.
7. Laleman W, Claria J, Van der Merwe S, Moreau R, Trebicka J. Systemic Inflammation and Acute-on-Chronic Liver Failure: Too Much, Not Enough. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology*. 2018;2018:1027152.
8. Guadalupe GT. Cirrhosis and its Sequelae. In: Goldman L, Schafer AI, editors. *Goldman-Cecil Medicine*. 25th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 1023-31.
9. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2014;383(9930):1749-61.
10. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *Journal of hepatology*. 2006;44(1):217-31.
11. Collaborators GBDC. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2020;5(3):245-66.
12. *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*. Geneva, World Health Organization; 2018
13. *Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. *Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
14. *Guía de práctica clínica Diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia hepática crónica*. Mexico: Secretaría de Salud; 2009.
15. *Características registradas de las defunciones en México durante 2018 [press release]*. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 31 de octubre 2019. Available from: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>.
16. *Estadísticas de Defunciones Registradas 2021 (preliminar) [press release]*. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 27 de julio 2022. Available from: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021\\_07.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021_07.pdf).
17. Social DGdC. Hepatitis C, segunda causa de cirrosis hepática en el país Mexico2016 [cited 2019]. Available from: [http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016\\_501.html](http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016_501.html).
18. *Global Health Estimates 2016 Summary Tables: DALYs by Cause, Age and Sex, by WHO Region, 2000-2016*. Geneva, World Health Organization; 2018.
19. *Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*. Geneva, World Health Organization; 2018.
20. *Global Health Estimates 2016 Summary Tables: YLLs by Cause, Age and Sex, by WHO Region, 2000-2016*. Geneva, World Health Organization; 2018.

21. Informe sobre la salud de los mexicanos 2015 Diagnóstico general de la salud poblacional. 1 ed. Mexico: Secretaria de Salud; 2015. 200 p.
22. Global Health Estimates 2016: Projections of Deaths by Cause, Age, Sex, by WHO Region. Geneva, World Health Organization; 2018
23. Ohnishi H, Sugihara J, Moriwaki H, Muto Y. [Acute-on-chronic liver failure]. *Ryoikibetsu shokogun shirizu*. 1995(7):217-9.
24. Schmidt LE, Svendsen LB, Sorensen VR, Hansen BA, Larsen FS. Cerebral blood flow velocity increases during a single treatment with the molecular adsorbents recirculating system in patients with acute on chronic liver failure. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2001;7(8):709-12.
25. Sen S, Davies NA, Mookerjee RP, Cheshire LM, Hodges SJ, Williams R, et al. Pathophysiological effects of albumin dialysis in acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled study. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2004;10(9):1109-19.
26. Jalan R, Yurdaydin C, Bajaj JS, Acharya SK, Arroyo V, Lin HC, et al. Toward an improved definition of acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology*. 2014;147(1):4-10.
27. Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1426-37, 37 e1-9.
28. Moreau R. Acute-on-chronic liver failure: a new syndrome in cirrhosis. *Clinical and molecular hepatology*. 2016;22(1):1-6.
29. Sole C, Sola E, Morales-Ruiz M, Fernandez G, Huelin P, Graupera I, et al. Characterization of Inflammatory Response in Acute-on-Chronic Liver Failure and Relationship with Prognosis. *Scientific reports*. 2016;6:32341.
30. Claria J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, et al. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology*. 2016;64(4):1249-64.
31. Claria J, Arroyo V, Moreau R. The Acute-on-Chronic Liver Failure Syndrome, or When the Innate Immune System Goes Astray. *Journal of immunology*. 2016;197(10):3755-61.
32. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Innate Immunity*. Cellular and Molecular Immunology. 9th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2018.
33. Monteiro S, Grandt J, Uschner FE, Kimer N, Madsen JL, Schierwagen R, et al. Differential inflammasome activation predisposes to acute-on-chronic liver failure in human and experimental cirrhosis with and without previous decompensation. *Gut*. 2020.
34. Jia Y, Ma L, Wang Y, Wang W, Shen C, Wang X, et al. NLRP3 inflammasome and related cytokines reflect the immune status of patients with HBV-ACLF. *Molecular immunology*. 2020;120:179-86.
35. Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *Journal of hepatology*. 2014;61(6):1385-96.
36. Simonetto D, Asrani S, Kamath P. Acute-on-Chronic Liver Failure. In: Sanyal A, Norah T, Lindor T, editors. *Zakim and Boyer's Hepatology*. 7th ed. United States: Elsevier 2017. p. 324-32.
37. Jalan R, Saliba F, Pavesi M, Amoros A, Moreau R, Gines P, et al. Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute-on-chronic liver failure. *Journal of hepatology*. 2014;61(5):1038-47.
38. Gustot T, Fernandez J, Garcia E, Morando F, Caraceni P, Alessandria C, et al. Clinical Course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. *Hepatology*. 2015;62(1):243-52.

39. Finkenstedt A, Nachbaur K, Zoller H, Joannidis M, Pratschke J, Graziadei IW, et al. Acute-on-chronic liver failure: excellent outcomes after liver transplantation but high mortality on the wait list. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2013;19(8):879-86.
40. Artru F, Louvet A, Ruiz I, Levesque E, Labreuche J, Ursic-Bedoya J, et al. Liver transplantation in the most severely ill cirrhotic patients: A multicenter study in acute-on-chronic liver failure grade 3. *Journal of hepatology*. 2017;67(4):708-15.
41. Arroyo V, Moreau R, Kamath PS, Jalan R, Gines P, Nevens F, et al. Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2:16041.
42. Garg V, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology*. 2012;142(3):505-12 e1.
43. Fujimoto Z, Tateno H, Hirabayashi J. Lectin structures: classification based on the 3-D structures. *Methods in molecular biology*. 2014;1200:579-606.
44. Lakhtin V, Lakhtin M, Alyoshkin V. Lectins of living organisms. The overview. *Anaerobe*. 2011;17(6):452-5.
45. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine*. 2008;10:e17.
46. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *Journal of immunology*. 1982;128(3):1221-8.
47. Albrandt K, Orida NK, Liu FT. An IgE-binding protein with a distinctive repetitive sequence and homology with an IgG receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(19):6859-63.
48. Cherayil BJ, Weiner SJ, Pillai S. The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *The Journal of experimental medicine*. 1989;170(6):1959-72.
49. Woo HJ, Shaw LM, Messier JM, Mercurio AM. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(13):7097-9.
50. Cherayil BJ, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(18):7324-8.
51. Raz A, Pazerini G, Carmi P. Identification of the metastasis-associated, galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein. *Cancer research*. 1989;49(13):3489-93.
52. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76(4):597-8.
53. Diaz-Alvarez L, Ortega E. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:9247574.
54. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(13):6737-42.
55. Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer research*. 2005;65(16):7292-300.
56. Gaudin JC, Mehul B, Hughes RC. Nuclear localisation of wild type and mutant galectin-3 in transfected cells. *Biology of the cell*. 2000;92(1):49-58.
57. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(4):1213-7.

58. Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*. 2002;21(52):8001-10.
59. Massa SM, Cooper DN, Leffler H, Barondes SH. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry*. 1993;32(1):260-7.
60. Dong S, Hughes RC. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconjugate journal*. 1997;14(2):267-74.
61. Jeng KC, Frigeri LG, Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunology letters*. 1994;42(3):113-6.
62. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *Journal of immunology*. 1995;154(7):3479-87.
63. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *International journal of molecular medicine*. 2018;41(2):599-614.
64. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *The American journal of pathology*. 2000;156(3):1073-83.
65. Mehul B, Hughes RC. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *Journal of cell science*. 1997;110 ( Pt 10):1169-78.
66. Stewart SE, Menzies SA, Popa SJ, Savinykh N, Petrunkina Harrison A, Lehner PJ, et al. A genome-wide CRISPR screen reconciles the role of N-linked glycosylation in galectin-3 transport to the cell surface. *Journal of cell science*. 2017;130(19):3234-47.
67. Chen Y, Wang H, Shen J, Deng R, Yao X, Guo Q, et al. Gasdermin D Drives the Nonexosomal Secretion of Galectin-3, an Insulin Signal Antagonist. *Journal of immunology*. 2019;203(10):2712-23.
68. Dumic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1760(4):616-35.
69. Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, et al. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *Journal of immunology*. 2008;181(4):2781-9.
70. Mishra BB, Li Q, Steichen AL, Binstock BJ, Metzger DW, Teale JM, et al. Galectin-3 functions as an alarmin: pathogenic role for sepsis development in murine respiratory tularemia. *PloS one*. 2013;8(3):e59616.
71. Bhaumik P, St-Pierre G, Milot V, St-Pierre C, Sato S. Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection. *Journal of immunology*. 2013;190(2):630-40.
72. Schroen B, Heymans S, Sharma U, Blankesteyn WM, Pokharel S, Cleutjens JP, et al. Thrombospondin-2 is essential for myocardial matrix integrity: increased expression identifies failure-prone cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2004;95(5):515-22.
73. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*. 2004;110(19):3121-8.
74. FDA. 510(k) Substantial equivalence determination decision summary: Review memorandum K093758; 2010. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf9/k093758.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf9/k093758.pdf).
75. O'Seaghdha CM, Hwang SJ, Ho JE, Vasan RS, Levy D, Fox CS. Elevated galectin-3 precedes the development of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(9):1470-7.

76. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(13):5060-5.
77. Cervantes-Alvarez E, Limon-de la Rosa N, Vilatoba M, Perez-Monter C, Hurtado-Gomez S, Martinez-Cabrera C, et al. Galectin-3 is overexpressed in advanced cirrhosis and predicts post-liver transplant infectious complications. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2022;42(10):2260-73.
78. Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer*. 1999;81(4):519-26.
79. Wanninger J, Weigert J, Wiest R, Bauer S, Karrasch T, Farkas S, et al. Systemic and hepatic vein galectin-3 are increased in patients with alcoholic liver cirrhosis and negatively correlate with liver function. *Cytokine*. 2011;55(3):435-40.
80. Traber PG, Chou H, Zomer E, Hong F, Klyosov A, Fiel MI, et al. Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease. *PLoS one*. 2013;8(10):e75361.
81. Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2014;351(2):336-43.
82. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, et al. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: a major scavenging role for galectin-3 in liver. *Journal of hepatology*. 2011;54(5):975-83.
83. Traber PG, Zomer E. Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors. *PLoS one*. 2013;8(12):e83481.
84. Chalasani N, Abdelmalek MF, Garcia-Tsao G, Vuppalanchi R, Alkhoury N, Rinella M, et al. Effects of Belapectin, an Inhibitor of Galectin-3, in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With Cirrhosis and Portal Hypertension. *Gastroenterology*. 2020;158(5):1334-45 e5.
85. Gudowska M, Gruszewska E, Cylwik B, Panasiuk A, Rogalska M, Flisiak R, et al. Galectin-3 Concentration in Liver Diseases. *Annals of clinical and laboratory science*. 2015;45(6):669-73.
86. Hsieh WC, Mackinnon AC, Lu WY, Jung J, Boulter L, Henderson NC, et al. Galectin-3 regulates hepatic progenitor cell expansion during liver injury. *Gut*. 2015;64(2):312-21.
87. Argemi J, Latasa MU, Atkinson SR, Blokhin IO, Massey V, Gue JP, et al. Defective HNF4alpha-dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nature communications*. 2019;10(1):3126.
88. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676-82.
89. Muttterer J, Zinck E. Quick-and-clean article figures with FigureJ. *Journal of microscopy*. 2013;252(1):89-91.
90. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Annals of surgery*. 2004;240(2):205-13.
91. Sundaram V, Shah P, Wong RJ, Karvellas CJ, Fortune BE, Mahmud N, et al. Patients With Acute on Chronic Liver Failure Grade 3 Have Greater 14-Day Waitlist Mortality Than Status-1a Patients. *Hepatology*. 2019;70(1):334-45.
92. Singal AK, Wong RJ, Jalan R, Asrani S, Kuo YF. Primary biliary cholangitis has the highest waitlist mortality in patients with cirrhosis and acute on chronic liver failure awaiting liver transplant. *Clinical transplantation*. 2021;35(12):e14479.
93. Kim JE, Sinn DH, Choi GS, Kim JM, Joh JW, Kang W, et al. Predictors and outcome of emergent Liver transplantation for patients with acute-on-chronic liver failure. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2021;53(8):1004-10.

94. Sundaram V, Patel S, Shetty K, Lindenmeyer CC, Rahimi RS, Flocco G, et al. Risk Factors for Posttransplantation Mortality in Recipients With Grade 3 Acute-on-Chronic Liver Failure: Analysis of a North American Consortium. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2022.
95. Sundaram V, Mahmud N, Perricone G, Katarey D, Wong RJ, Karvellas CJ, et al. Longterm Outcomes of Patients Undergoing Liver Transplantation for Acute-on-Chronic Liver Failure. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2020;26(12):1594-602.
96. Abdallah MA, Waleed M, Bell MG, Nelson M, Wong R, Sundaram V, et al. Systematic review with meta-analysis: liver transplant provides survival benefit in patients with acute on chronic liver failure. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2020;52(2):222-32.
97. Artzner T, Michard B, Weiss E, Barbier L, Noorah Z, Merle JC, et al. Liver transplantation for critically ill cirrhotic patients: Stratifying utility based on pretransplant factors. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2020;20(9):2437-48.
98. Zhang S, Suen SC, Gong CL, Pham J, Trebicka J, Duvoux C, et al. Early transplantation maximizes survival in severe acute-on-chronic liver failure: Results of a Markov decision process model. *JHEP reports : innovation in hepatology*. 2021;3(6):100367.
99. Gustot T, Jalan R. Acute-on-chronic liver failure in patients with alcohol-related liver disease. *Journal of hepatology*. 2019;70(2):319-27.
100. Kim HY, Chang Y, Park JY, Ahn H, Cho H, Han SJ, et al. Characterization of acute-on-chronic liver failure and prediction of mortality in Asian patients with active alcoholism. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2016;31(2):427-33.
101. Hernaez R, Liu Y, Kramer JR, Rana A, El-Serag HB, Kanwal F. Model for end-stage liver disease-sodium underestimates 90-day mortality risk in patients with acute-on-chronic liver failure. *Journal of hepatology*. 2020;73(6):1425-33.
102. Belli LS, Duvoux C, Artzner T, Bernal W, Conti S, Cortesi PA, et al. Liver transplantation for patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF) in Europe: results of the ELITA/EF-CLIF collaborative study (ECLIS). *Journal of hepatology*. 2021.
103. Mahmud N, Sundaram V, Kaplan DE, Taddei TH, Goldberg DS. Grade 1 Acute on Chronic Liver Failure is a Predictor for Subsequent Grade 3 Failure. *Hepatology*. 2019.
104. Ferreira Cardoso M, Alexandrino G, Carvalho EBJ, Anapaz V, Carvalho R, Horta D, et al. The impact and evolution of acute-on-chronic liver failure in decompensated cirrhosis: A Portuguese single-center study. *Gastroenterologia y hepatologia*. 2019;42(5):296-303.
105. Marciano S, Mauro E, Giunta D, Torres MC, Diaz JM, Bermudez C, et al. Impact of acute-on-chronic liver failure on post-transplant survival and on kidney outcomes. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2019;31(9):1157-64.
106. O'Leary JG, Bajaj JS, Tandon P, Biggins SW, Wong F, Kamath PS, et al. Outcomes After Listing for Liver Transplant in Patients With Acute-on-Chronic Liver Failure: The Multicenter North American Consortium for the Study of End-Stage Liver Disease Experience. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2019;25(4):571-9.
107. Yadav SK, Saraf N, Choudhary NS, Sah JK, Sah SK, Rastogi A, et al. Living Donor Liver Transplantation for Acute-on-Chronic Liver Failure. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2019;25(3):459-68.
108. Cervantes-Alvarez E, Vilatoba M, Limon-de la Rosa N, Mendez-Guerrero O, Kershenovich D, Torre A, et al. Liver transplantation is beneficial regardless of cirrhosis stage or acute-on-chronic liver failure grade: A single-center experience. *World J Gastroenterol* Forthcoming 2022. 2022.

109. Feuk-Lagerstedt E, Jordan ET, Leffler H, Dahlgren C, Karlsson A. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *Journal of immunology*. 1999;163(10):5592-8.
110. Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunological reviews*. 2016;273(1):48-60.
111. Sun HY, Cacciarelli TV, Singh N. Identifying a targeted population at high risk for infections after liver transplantation in the MELD era. *Clinical transplantation*. 2011;25(3):420-5.
112. Saliba F, Delvart V, Ichai P, Kassis N, Botterel F, Mihaila L, et al. Fungal infections after liver transplantation: outcomes and risk factors revisited in the MELD era. *Clinical transplantation*. 2013;27(4):E454-61.
113. Petrowsky H, Rana A, Kaldas FM, Sharma A, Hong JC, Agopian VG, et al. Liver transplantation in highest acuity recipients: identifying factors to avoid futility. *Annals of surgery*. 2014;259(6):1186-94.
114. Zhao L, Westerhoff M, Pai RK, Choi WT, Gao ZH, Hart J. Centrilobular ductular reaction correlates with fibrosis stage and fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2018;31(1):150-9.
115. Trebicka J, Amoros A, Pitarch C, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Schierwagen R, et al. Addressing Profiles of Systemic Inflammation Across the Different Clinical Phenotypes of Acutely Decompensated Cirrhosis. *Frontiers in immunology*. 2019;10:476.
116. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C, et al. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS one*. 2011;6(6):e21381.
117. Queck A, Bode H, Uschner FE, Brol MJ, Graf C, Schulz M, et al. Systemic MCP-1 Levels Derive Mainly From Injured Liver and Are Associated With Complications in Cirrhosis. *Frontiers in immunology*. 2020;11:354.
118. Yu J, Shi X, Ma J, Chen R, Dong S, Lu S, et al. C-Reactive Protein Is an Independent Predictor of 30-Day Bacterial Infection Post-Liver Transplantation. *Biomolecules*. 2021;11(8).
119. Baganate F, Beal EW, Tumin D, Azoulay D, Mumtaz K, Black SM, et al. Early mortality after liver transplantation: Defining the course and the cause. *Surgery*. 2018;164(4):694-704.
120. Pedersen M, Seetharam A. Infections after orthotopic liver transplantation. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2014;4(4):347-60.
121. Chung AW, Sieling PA, Schenk M, Teles RM, Krutzik SR, Hsu DK, et al. Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(6):947-56.
122. Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas JL, Li W. Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(2):401-7.
123. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(5):327-36.
124. Bernsmeier C, Pop OT, Singanayagam A, Triantafyllou E, Patel VC, Weston CJ, et al. Patients with acute-on-chronic liver failure have increased numbers of regulatory immune cells expressing the receptor tyrosine kinase MERTK. *Gastroenterology*. 2015;148(3):603-15 e14.
125. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Floisand Y. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scandinavian journal of immunology*. 2010;71(4):267-74.
126. Jevdjic J, Surbatovic M, Milosavljevic S, Rondovic G, Stanojevic I, Eric S, et al. Galectin-3 in Critically Ill Patients with Sepsis and/or Trauma: A Good Predictor of Outcome or Not? *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2019;0(0):-.
127. Prud'homme M, Coutrot M, Michel T, Boutin L, Genest M, Poirier F, et al. Acute Kidney Injury Induces Remote Cardiac Damage and Dysfunction Through the Galectin-3 Pathway. *JACC Basic to translational science*. 2019;4(6):717-32.

128. Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Tihaa L, Haas U, Weiskirchen R. Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. *Journal of inflammation*. 2012;9(1):49.
129. Jeftic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Molecular medicine*. 2015;21:453-65.
130. Ramachandran P, Dobie R, Wilson-Kanamori JR, Dora EF, Henderson BEP, Luu NT, et al. Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level. *Nature*. 2019;575(7783):512-8.
131. Guzman-Lepe J, Cervantes-Alvarez E, Collin de l'Hortet A, Wang Y, Mars WM, Oda Y, et al. Liver-enriched transcription factor expression relates to chronic hepatic failure in humans. *Hepatology communications*. 2018;2(5):582-94.
132. Sarfraz S, Hamid S, Siddiqui A, Hussain S, Pervez S, Alexander G. Altered expression of cell cycle and apoptotic proteins in chronic hepatitis C virus infection. *BMC microbiology*. 2008;8:133.
133. Gutierrez-Reyes G, del Carmen Garcia de Leon M, Varela-Fascinetto G, Valencia P, Perez Tamayo R, Rosado CG, et al. Cellular senescence in livers from children with end stage liver disease. *PloS one*. 2010;5(4):e10231.
134. Nishikawa T, Bell A, Brooks JM, Setoyama K, Melis M, Han B, et al. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(4):1533-44.
135. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tshuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, et al. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(9):935-42.
136. Zhang D, Jiang M, Miao D. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. *PloS one*. 2011;6(2):e16789.
137. Li SY, Davidson PJ, Lin NY, Patterson RJ, Wang JL, Arnoys EJ. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. II. Identification of the signal for nuclear export. *Glycobiology*. 2006;16(7):612-22.
138. Nakahara S, Oka N, Wang Y, Hogan V, Inohara H, Raz A. Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3. *Cancer research*. 2006;66(20):9995-10006.
139. Laing JG, Wang JL. Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *Biochemistry*. 1988;27(14):5329-34.
140. Fritsch K, Mernberger M, Nist A, Stiewe T, Brehm A, Jacob R. Galectin-3 interacts with components of the nuclear ribonucleoprotein complex. *BMC cancer*. 2016;16:502.
141. Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini C, et al. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;302(3):545-53.
142. Lau HH, Ng NHJ, Loo LSW, Jasmen JB, Teo AKK. The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver. *Journal of hepatology*. 2018;68(5):1033-48.
143. Costa RH, Holterman AX, Rausa FM, Adami GR. Gene regulation and in vivo function of liver transcription factors. In: Arias IM, et al., editors. *The liver: biology and pathobiology*. 4th ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
144. Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer research*. 1999;59(16):4148-54.
145. Jia W, Kong L, Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Hayashi Y, et al. Indispensable role of Galectin-3 in promoting quiescence of hematopoietic stem cells. *Nature communications*. 2021;12(1):2118.

146. Yang F, Zhang F, Ji X, Jiang X, Xue M, Yu H, et al. Secretory galectin-3 induced by glucocorticoid stress triggers stemness exhaustion of hepatic progenitor cells. *The Journal of biological chemistry*. 2020;295(49):16852-62.
147. Song M, Pan Q, Yang J, He J, Zeng J, Cheng S, et al. Galectin-3 favours tumour metastasis via the activation of beta-catenin signalling in hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer*. 2020;123(10):1521-34.
148. Del Turco S, De Simone P, Ghinolfi D, Gaggini M, Basta G. Comparison between galectin-3 and YKL-40 levels for the assessment of liver fibrosis in cirrhotic patients. *Arab journal of gastroenterology : the official publication of the Pan-Arab Association of Gastroenterology*. 2021;22(3):187-92.
149. Oikonomou T, Orfanidou A, Goulis I, Ntogramatzi F, Athanasiadou Z, Papatheodoridis GV, et al. New prognostic score based on galectin-3 has similar performance to model for end-stage liver disease and sodium score in patients with stable decompensated cirrhosis. *Annals of gastroenterology*. 2021;34(5):728-35.
150. Cervantes-Alvarez E, la Rosa NL, la Mora MS, Valdez-Sandoval P, Palacios-Jimenez M, Rodriguez-Alvarez F, et al. Galectin-3 as a potential prognostic biomarker of severe COVID-19 in SARS-CoV-2 infected patients. *Scientific reports*. 2022;12(1):1856.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO, A 13 DE DICIEMBRE DE 2017

OFICIO No. MCONTROL-207/2017

**DRA. NALU NAVARRO ALVÁREZ**  
**INVESTIGADORA PRINCIPAL**  
**DEPTO. DE GASTROENTEROLOGÍA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN, SALVADOR ZUBIRÁN**  
**VASCO DE QUIROGA No. 15**  
**COL. SECCIÓN XVI, DEL. TLALPAN**  
**CIUDAD DE MÉXICO, C.P. 14080**  
**PRESENTE**

Por este medio, nos permitimos informarle que el **Comité de Investigación**, así como el **Comité de Ética en Investigación** del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha revisado y aprobado el **Protocolo de Investigación Clínica**, titulado:

**"EL ROL DE LA GALECTINA-3 COMO MEDIADOR INFLAMATORIO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA SOBRE CRÓNICA"**  
**VERSIÓN SEPTIEMBRE 2017**  
**Ref. 2368**

La vigencia de la aprobación termina el día 13 de diciembre de 2018. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

Sin más por el momento quedamos de usted.

ATENTAMENTE,

**DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS**  
**PRESIDENTE**  
**COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**

**DR. ARTURO GALINDO FRAGA**  
**PRESIDENTE**  
**COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN**

Avenida Vasco de  
Quiroga s.p. DN Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación  
Colonia CALSAOFRING  
Domínguez Sección XVI  
Del egación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO, A 17 DE AGOSTO DE 2017

**DRA. NALÚ NAVARRO ÁLVAREZ**  
**INVESTIGADORA PRINCIPAL**  
**DEPTO. DE GASTROENTEROLOGÍA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"**  
**AV. VASCO DE QUIROGA NO. 15**  
**COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI**  
**CIUDAD DE MÉXICO, C.P. 14080**  
**PRESENTE**

Por este medio, nos permitimos informarle que el **COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**, así como el **COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN** del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, han revisado y aprobado el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

**"PERFIL TRANSCRIPCIONAL DEL HÍGADO CIRRÓTICO, SUS APLICACIONES CLÍNICAS Y PERSPECTIVAS FUTURAS HACIA LA RESTAURACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA"**

VERSIÓN AGOSTO 2017

REF. 2247

Así mismo se revisó y aprobó la siguiente documentación:

- **Carta de consentimiento informado, Versión 2, del 20 de julio de 2017**

La vigencia de la aprobación termina el día 17 de agosto de 2018. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

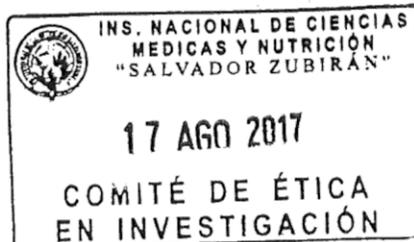
Sin más por el momento quedamos de usted.

ATENTAMENTE,

  
**DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS**  
**PRESIDENTE**  
**COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**

  
**DR. ARTURO GALINDO FRAGA**  
**PRESIDENTE**  
**COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN**

Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52) 54870900  
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRICION  
SALVADOR ZUBIRAN

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:

### EL ROL DE LA GALECTINA-3 COMO MEDIADOR INFLAMATORIO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA AGUDA SOBRE CRÓNICA.

**Investigador principal:** Dra. Nalú Navarro Álvarez  
**Dirección del investigador:** Departamento de Gastroenterología  
**Teléfono de contacto del investigador:** 55 5487 0900 ext. 2711).  
**Teléfono de contacto de 24hrs del investigador:** 55 7455 8838  
**Investigadores participantes:** Eduardo Cervantes Álvarez  
**Nombre del patrocinador del estudio:**  
Eduardo Cervantes Álvarez, Dr. Mario Vilatobá Chapa, Dr. Ignacio García Juárez, Dr. David Kershenobich, Dr. Carlos Pérez Monter, Sahara Hurtado Gómez.

**Versión del consentimiento informado y fecha de su preparación:** 18 de Octubre, 2017. Versión 2

### INTRODUCCIÓN:

Este documento es una invitación a participar en un estudio de investigación del Instituto. Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento; pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar o no como sujeto de investigación en este proyecto. El investigador le debe explicar ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y **usted tendrá todo el tiempo que requiera para pensar, solo o con quien usted decida consultarlo, antes de decidir si acepta participar**. Cualquiera que sea su decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Instituto.

Con el fin de tomar una decisión verdaderamente informada sobre si acepta participar o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los posibles riesgos y beneficios a su salud al participar. Este documento le dará información detallada acerca del estudio de investigación, la cual podrá comentar quien usted quiera, por ejemplo, un familiar, su médico tratante, el investigador principal de este estudio o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final, una vez leída y entendida esta información, se le invitará a que forme parte del proyecto y si usted acepta, sin ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki, y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Al final de la explicación, usted debe entender los puntos siguientes:

- I. La justificación y los objetivos de la investigación.
- II. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de qué son



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRICION  
SALVADOR ZUBIRAN

- procedimientos experimentales.
- III. Los riesgos o molestias previstos.
  - IV. Los beneficios que se pueden observar.
  - V. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para usted
  - VI. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
  - VII. La libertad que tiene de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se afecte su atención y el tratamiento en el Instituto.
  - VIII. La seguridad de que no se le va a identificar de forma particular y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
  - IX. El compromiso del investigador de proporcionarle la información actualizada que pueda ser obtenida durante el estudio, aunque esto pudiera afectar a su disposición para continuar con su participación.
  - X. La disponibilidad del tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación.

**Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de tomar una decisión final en los días futuros.**

## **INVITACION A PARTICIPAR COMO SUJETO DE INVESTIGACION Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

Estimado(a) Sr(a). \_\_\_\_\_

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), a través del grupo de investigación del departamento de Gastroenterología y Trasplante, le invitan a participar en el presente estudio que tiene como objetivo estudiar los mecanismos que podrían estar causando el empeoramiento de su enfermedad hepática, evaluando la expresión de moléculas en muestras de hígado y de sangre.

Usted fue invitado al estudio debido a que se le realizó o se le realizará cirugía de trasplante hepático, por padecer alguna enfermedad del hígado.

## **PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

Si usted acepta participar en este estudio, el procedimiento a seguir será el siguiente: Durante su cirugía, se extrajo o se extraerá una muestra de aproximadamente 1 cm de su hígado enfermo una vez que se le haya quitado. Dicha muestra está almacenada o será almacenada para evaluar posteriormente moléculas que pueden estar asociadas con el deterioro de su enfermedad hepática. Su muestra de hígado será comparada con la de otros pacientes con y sin enfermedad del hígado. Por lo que se le pide su consentimiento para utilizar también un pedacito del hígado sano que se le va a trasplantar o se le trasplantó.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRICION  
SALVADOR ZUBIRAN

De igual manera, como parte de su procedimiento de trasplante, a usted se le toma una muestra de sangre de rutina la cual se compara con la muestra de sangre de su donador para ver qué tan compatibles son. Estas muestras se almacenan para cualquier aclaración que pudiera surgir antes, durante y después de su trasplante. Por lo que se solicita su aprobación para utilizar una porción de esa muestra para medir algunas sustancias que nos ayudarán a entender el mecanismo por el cual su hígado se deterioró. También como parte de su seguimiento posterior a su trasplante, a usted se le toman exámenes de sangre para evaluar el funcionamiento adecuado de su hígado trasplantado, una parte de las cuales se utilizaría para fines de investigación bajo su aprobación.

### **RIESGOS E INCONVENIENTES**

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. No se consideran riesgos por la obtención de una muestra de su hígado, ya que se tomará una vez que éste sea removido de su cuerpo durante su cirugía de trasplante. La muestra del hígado sano que se le va a trasplantar se tomará antes de que le sea trasplantado.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad, la cual será protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.

### **BENEFICIOS POTENCIALES**

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, la búsqueda y análisis de moléculas que se encuentran alterados en la enfermedad del hígado podría permitir comprender mejor las causas que conducen a la falla del hígado. Gracias a su participación altruista, su comunidad se podrá beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de atender esta complicación médica.

### **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno.

### **COMPENSACION**

No se realizará ningún tipo de compensación por su participación en el estudio

### **ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:**

Su participación es voluntaria, por lo que usted puede elegir no participar en el estudio. En caso de decidir no participar, usted seguirá recibiendo el tratamiento o manejo habitual (estándar) para su enfermedad.

### **POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:**

Los resultados o materiales obtenidos en el estudio serán propiedad del INCMNSZ. Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto o quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero por el mismo.

### **ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:**



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Usted puede solicitar los resultados de las conclusiones del estudio a la Dra. Nalú Navarro Álvarez del INCMNSZ (teléfono 55 5487 0900 ext. 2711). La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

### ***PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:***

Recuerde que su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, tanto su relación habitual con el INCMNSZ como su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho no se verán afectados. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el INCMNSZ. Se le informará a tiempo si se obtiene nueva información que pueda afectar su decisión para continuar en el estudio.

El investigador del estudio puede excluirlo del estudio si su muestra preservado en condiciones no se consiguió preservar en condiciones adecuadas para los análisis planteados.

### ***CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN***

Su nombre no será usado en ninguno de los estudios. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y serán codificadas con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal, las muestras biológicas, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas, así como su información médica y/o genética, puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto ni para la creación de líneas celulares inmortales, y estos estudios deberán ser sometidos a aprobación por un Comité de Ética.

Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por 10 años.

Los códigos que identifican su muestra estarán sólo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Sólo los investigadores tendrán acceso a ellos. El personal del estudio (monitores o auditores) podrá tener acceso a la información de los participantes.

Si bien existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio, su confidencialidad será protegida como lo marca la ley, asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o
- Es solicitado por la ley.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.

El Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ aprobó la realización de este estudio. Dicho comité



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRICION  
SALVADOR ZUBIRAN

es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con el Comité de Ética en Investigación para decidir la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice contactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

### **IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:**

Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con la Dra. Nalú Navarro Álvarez en el INCMNSZ (teléfono: 55 5487 0900, ext. 2711)

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga. Teléfono 54870900, ext. 6101).

### **DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

- Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.
- Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas para ser utilizadas con fines de investigación. Así mismo, mi información médica podrá ser utilizada con los mismos fines.
- Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.
- Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas:

<b>SÍ</b>	<b>NO</b>
<b>(marque</b>	<b>(marque</b>
<b>por</b>	<b>por</b>
<b>favor)</b>	<b>favor)</b>



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRICION  
SALVADOR ZUBIRAN

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
a. ¿Ha leído y entendido el formato de consentimiento informado, en su lengua materna?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. ¿Entiende los posibles riesgos de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### Declaración del paciente:

Yo, \_\_\_\_\_ declaro que es mi decisión participar como sujeto de investigación clínica en el estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si no participo no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en este estudio. Si tengo preguntas sobre el estudio, puedo ponerme en contacto con la Dra. Nalú Navarro Álvarez (teléfono: 55 5487 0900, ext. 2711). Para preguntas sobre mis derechos como participante en el estudio, problemas, preocupaciones o preguntas, así como para obtener información y ofrecer información, hablaré con el presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga. Teléfono 54870900. ext. 6101).

He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibirá una copia firmada de este consentimiento informado.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRICION  
SALVADOR ZUBIRAN

**Declaración del familiar que autorizará la participación del paciente en este estudio:**

Yo, \_\_\_\_\_ (parentesco con el paciente) \_\_\_\_\_ de  
(nombre del paciente) \_\_\_\_\_ declaro que es mi decisión aceptar la  
participación voluntaria como sujeto de investigación clínica en el estudio de  
\_\_\_\_\_ (nombre del paciente).

He sido informado que puedo negarme a autorizar o terminar la participación de mi familiar en  
cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios.

Si tengo preguntas sobre el estudio, puedo ponerme en contacto con la Dra. Nalú Navarro Álvarez en  
el INCMNSZ (teléfono: 55 5487 0900, ext. 2711).

\_\_\_\_\_  
Nombre del / de la Participante

\_\_\_\_\_  
Firma del / de la Participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Coloque la huella digital del participante sobre esta línea si no sabe escribir

\_\_\_\_\_  
Nombre del representante legal o familiar (si aplica)

\_\_\_\_\_  
Firma del representante legal o familiar

\_\_\_\_\_  
Fecha



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRICION  
SALVADOR ZUBIRAN

Nombre del Investigador o médico

Firma del Investigador que explicó el documento

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Fecha

Dirección: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Fecha

Dirección: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Lugar y Fecha: \_\_\_\_\_

**(El presente documento es original y consta de 8 páginas)**