



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Estudio de Genes KIR en Pacientes con
Abuso de Alcohol que Desarrollan
Cirrosis Hepática Alcohólica**

D^a. Elena María Navarro Noguera

2017



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE GENES KIR EN PACIENTES CON
ABUSO DE ALCOHOL QUE DESARROLLAN
CIRROSIS HEPÁTICA ALCOHÓLICA**

Dirigida por:

Dra. Dña. Isabel Legaz Pérez

Dra. Dña. María Rocío Álvarez López

**Elena María Navarro Noguera
2017**

Este trabajo es el resultado de mucho esfuerzo y tiempo dedicados, pero jamás hubiera podido llegar a ver la luz sin todas las personas que me han ayudado.

Gracias a Isa, por su constancia, su paciencia y su tiempo dedicados. Por ser una persona tan cercana y amable. Creo que no podré compensarte jamás todo lo que has hecho. Mil gracias. A Manolo Miras, responsable de que ahora mismo esté aquí. Gracias por haberme impulsado en esta aventura, ha sido un gran privilegio poder aprender de ti. A Jose Miguel Bolarín, siempre con una sonrisa, por facilitarme tanto el camino a través del intrincado mundo de la estadística. A Manuel Ruiz, una pequeña parte de esto también es gracias a ti.

A todas las personas que de una forma u otra han participado en este trabajo y que no he nombrado.

A mi familia, por recibirme siempre con una sonrisa y hacer que siempre quiera volver al hogar. A Emeterio, por su saber estar y su discreción, por haber estado ahí desde el inicio de mi aprendizaje dispuesto a ayudar en lo que fuera, gracias por aportar tu granito de arena en estas páginas, y en mi vida. Eres un ejemplo a seguir.

A mis padres, por haber influido tanto en mi vida, siempre en silencio, desde la humildad y el respeto, apoyándome en cada decisión que he tomado. Os admiro muchísimo. Gracias por haber aguantado todas mis quejas y mis malos días. Gracias de corazón.

A Jose, que me ha dado tanto estos meses, incondicional, paciente... Nunca podré agradecerte todo lo que haces por mí. Eres el motor que me impulsa a mejorar cada día, y a valorar los pequeños detalles de la vida.

Y por último, quiero agradecer a Cristina, mi hermana, por todas las tardes recogiendo datos que pasó conmigo. Ella es esa persona que estará ahí para siempre pase lo que pase, y yo estaré para ella.

INDICE

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	17
ABSTRACT	21
1. INTRODUCCIÓN	25
1. Breve referencia histórica sobre el alcohol	27
2. Definición de alcoholismo	27
3. Diagnóstico de alcoholismo	28
4. Cálculo de la graduación alcohólica	29
5. Clasificación del consumo de alcohol	30
6. Epidemiología del consumo de alcohol	32
6.1. Consumo de alcohol a nivel mundial	32
6.2. Consumo de alcohol en la Unión Europea	33
6.3. Consumo de alcohol en España	34
7. Metabolismo del alcohol	37
8. Beneficios y enfermedades relacionadas con el alcohol	44
9. Generalidades sobre la cirrosis hepática alcohólica	47
9.1. Cirrosis y alcohol	47
9.2. Factores relacionados con el desarrollo de cirrosis alcohólica	48
10. Fisiopatología y progresión de la hepatopatía alcohólica crónica	52
10.1. Esteatosis hepática	54
10.2. Esteatohepatitis	56
10.3. Fibrosis hepática	59
10.4. Cirrosis hepática	61
11. Manifestaciones clínica y complicaciones de la cirrosis hepática	62
12. Diagnóstico de la cirrosis hepática alcohólica	67
12.1. Anamnesis y exploración física	67
12.2. Pruebas de laboratorio	68
12.3. Pruebas de imagen	70
12.4. Biopsia hepática	71
13. Evaluación pronóstica de la hepatopatía crónica	72
13.1. Clasificación de Child-Pugh	72
13.2. Escala MELD	74
14. Cirrosis hepática alcohólica y virus de la hepatitis C	76
15. Trasplante hepático como opción terapéutica de la cirrosis hepática alcohólica	77

15.1. Indicaciones generales del trasplante hepático	78
15.2. Selección de pacientes con cirrosis hepática para trasplante hepático	80
15.3. Evolución postrasplante hepático	83
16. Hígado e inmunidad innata	86
17. Efecto del alcohol sobre el sistema inmune	87
18. Mecanismos celulares y moleculares del desarrollo de fibrosis hepática inducida por alcohol	90
18.1. Mecanismos de esteatosis hepática inducida por alcohol	90
18.2. Efectos del alcohol sobre el sistema inmunitario	93
18.3. Células estrelladas hepáticas	98
18.3.1. Función de la célula estrellada hepática en hígado sano	99
18.3.2. Activación de la célula estrellada hepática	100
18.4. Células de Kupffer	103
18.5. Células <i>Natural Killer</i> en el hígado	104
18.5.1. Efecto antifibrótico de la célula NK	105
18.5.2. Efectos del alcohol sobre el número y actividad de las células NK	107
18.6. Mecanismos de lisis de célula estrellada hepática por células NK	108
19. Genes KIR	111
19.1. Nomenclatura y estructura de los receptores KIR	113
19.2. Genes KIR y tipos de haplotipos KIR	116
19.3. Genotipos KIR generales	118
19.4. Genotipos KIR específicos	119
19.5. Expresión y ligandos KIR	120
19.6. Localización de los genes KIR	125
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS	129
3. PACIENTES Y MÉTODOS	135
1. Pacientes y controles	137
2. Diagnóstico de cirrosis alcohólica	139
3. Determinación de los parámetros clínicos y analíticos	140
4. Diagnóstico de infecciones virales	142
5. Obtención y recogida de muestras	143
6. Extracción de ADN	146
7. Análisis de los genes KIR	150
7.1. Análisis de los genes KIR por PCR-SSO por tecnología Luminex®	152
7.1.1. Fundamento de la técnica	153

7.1.2. Protocolo de PCR-SSO	154
7.2. Análisis de los genes KIR mediante PCR-SSP	157
8. Análisis de los genotipos KIR	164
8.1. Análisis de genotipos KIR específicos	164
8.2. Análisis de genotipos KIR generales	164
9. Genotipado de ligandos HLA-C de clase I	165
9.1. Análisis de genotipado de HLA-C por PCR-SSO	165
9.2. Análisis de genotipado de HLA-C por PCR-SSO reversa	166
9.2.1. Reacción de amplificación	169
9.2.2. Reacción de hibridación	171
9.2.3. Reacción de detección	172
9.3. Genotipado de HLA	173
10. Análisis estadístico	174
4. RESULTADOS	175
CAPÍTULO 1. Epidemiología de la cirrosis alcohólica en la población de pacientes sometidos a trasplante hepático	177
1. Estudio de las principales indicaciones a trasplante hepático según el sexo del paciente	177
2. Influencia de la edad en la indicación de trasplante hepático	182
3. Frecuencia de las distintas indicaciones a trasplante hepático a lo largo del periodo 1990-2013	183
3.1. Evolución de la frecuencia de la cirrosis hepática alcohólica	184
3.2. Evolución de la frecuencia de la cirrosis hepática viral y de otras indicaciones menos frecuentes	185
3.3. Edad media de los pacientes con cirrosis hepática a los que se les realizó trasplante hepático (1988 a 2013)	188
4. Serie de pacientes con cirrosis hepática alcohólica con indicación a trasplante hepático	190
5. Pacientes con infecciones virales	193
5.1. Frecuencia de infecciones víricas asociadas a otras patologías con indicación a trasplante hepático	194
5.2. Estudio de la frecuencia de infecciones víricas en el trasplante hepático desde 1990 hasta 2013	195
6. Análisis de la supervivencia en la serie total de pacientes	196
6.1. Supervivencia de pacientes trasplantados por cirrosis alcohólica	197
6.2. Supervivencia de pacientes trasplantados por otras patologías	198
6.3. Supervivencia de pacientes trasplantados por infecciones virales	200

CAPÍTULO 2. Estudio de pacientes con cirrosis hepática alcohólica sometidos a trasplante hepático y de genes KIR/HLA	203
1. Características demográficas y clínicas de los pacientes varones con cirrosis alcohólica	203
1.1. Características demográficas y analíticas de los pacientes con cirrosis alcohólica	204
1.2. Factores bioquímicos en pacientes con cirrosis alcohólica	209
1.3. Índices pronósticos clínicos de la cirrosis hepática alcohólica en pacientes no infectados e infectados por virus	212
1.4. Infecciones virales en la población de pacientes con cirrosis alcohólica	214
2. Genes KIR y cirrosis hepática alcohólica	215
2.1. Frecuencia de genes KIR inhibidores en pacientes con cirrosis alcohólica y controles	215
2.2. Frecuencias de genes KIR activadores en pacientes con cirrosis alcohólica y controles	219
2.3. Relación entre la frecuencia de genes KIR en pacientes con cirrosis alcohólica y controles según grupos de edad	222
2.3.1. Pacientes del grupo de edad mayores de 54 años	223
2.3.2. Pacientes del grupo de edad menores o iguales de 54 años	227
2.4. Análisis de regresión logística multivariable	230
3. Estudio de asociación de genes KIR en individuos sanos y en el total de pacientes con cirrosis alcohólica	231
4. Frecuencia de asociación conjunta de KIR2DS5 y KIR2DS2 en individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica	234
5. Análisis de la frecuencia de KIR2DS2 y KIR2DS5 en individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica	236
5.1. Análisis de la frecuencia de KIR2DS5 y KIR2DS2 en individuos sanos y pacientes con cirrosis alcohólica con edad inferior a 54 años	238
5.2. Análisis de la frecuencia de KIR2DS5 y KIR2DS2 en individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica con edad superior a 54 años	239
6. Análisis de genotipos y haplotipos KIR generales y específicos en individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica	240
6.1. Genotipos KIR específicos en población sana y pacientes con cirrosis alcohólica	242
7. Análisis del número de genes KIR en pacientes con cirrosis alcohólica y en controles sanos	246
7.1. Análisis del total de genes KIR contenidos en los diferentes genotipos KIR	246
7.2. Genes KIR inhibidores presentes en los diferentes genotipos KIR en la población sana y en cirrosis alcohólica	249
7.3. Estudio del impacto de genes KIR activadores en cirrosis alcohólica	251
8. Papel del locus HLA-C en la cirrosis hepática alcohólica	253
8.1. Frecuencia de alelos HLA-C	253

8.2. Distribución de epítomos y genotipos HLA-C	255
8.3. Importancia de las combinaciones de genes KIR y sus correspondientes ligandos HLA-I en la cirrosis alcohólica	257
8.4. Combinaciones de genes KIR y genotipos HLA-C en pacientes con cirrosis alcohólica y controles sanos	260
5. DISCUSIÓN	263
6. CONCLUSIONES	295
7. ANEXOS	301
8. BIBLIOGRAFIA	309

ABREVIATURAS

ACC	Acetil CoA carboxilasa
2AG	2-araquidonoilglicerol
A	Ausencia
AC	Antes de Cristo
ADH	Alcohol deshidrogenasa
aKIR	Receptores de células asesinas similares a inmunoglobulina activadores
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AMP	Adenosin monofosfato
AMPK	Protein quinasa activada de adenosin monofosfato (del inglés, <i>AMP-activated protein kinase</i>)
Arg	Arginina
ARN-m	Ácido ribonucleico mensajero
Asn	Asparagina
ATP	Adenosin trifosfato
ATQ1	Antiquitin 1
C1qa	Complemento 1qa
C3	Complemento 3
CAGE	Del inglés, <i>Cuttingdown</i> , <i>Annoyed</i> , <i>Guilt</i> , <i>Eyeopen</i> , que en español significa, problemas relaciones con la reducción de alcohol, molestarse por las críticas, sentimiento de culpa y consumo de alcohol por la mañana
CB1	Cannabinoide tipo 1
CBP	Cirrosis biliar primaria
CDC	Centro para el Control y Prevención de enfermedad (del inglés, <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
CEH	Celula estrellada hepática
CHC	Carcinoma hepatocelular
CHRM2	Receptor muscarínico colinérgico M2 (del inglés, <i>muscarinic cholinergic receptor 2</i>)
CI	Intervalo de confianza
CMV	Citomegalovirus
CPT-1	Carnitina palmitoiltransferasa
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DEM	Desviación estándar de la media
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
DSM-IV	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (del inglés, <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EEUU	Estados Unidos
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ELTR	Registro Europeo de trasplante de hígado (del inglés, <i>European Liver Transplant Registry</i>)
F	Sentido (del inglés, <i>Foward</i>)
FA	Fosfatasa alcalina
FDA	Agencia de drogas y alimentos (del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>)
GABRA2	Receptor de ácido γ -aminobutírico A2 (del inglés, <i>γ-amino butyric acid receptor A2</i>)
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GISAH	OMS/Europa y el Sistema de Información Global sobre el Alcohol y la Salud (del inglés, <i>Europe and the Global Information System on Alcohol and Health</i>)
GOT	Transaminasa glutámico-oxalacética
GPT	Transaminasa glutámico-pirúvica
H	Hombre
HCUVA	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
HGNA	Hígado graso no alcohólico
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HLA	Antígeno leucocitario humano
HUGO	Organización sobre el Genoma Humano

Ig	Inmunoglobulina
iKIR	Receptores de células asesinas similares a inmunoglobulina inhibidores
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
INF-α	Interferón alpha
INF-γ	Interferon gamma
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
INR	International normalized ratio
ITAM	Motivos de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (del inglés, <i>immunoreceptor tyrosine-based activated motif</i>)
ITIM	Motivos de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (del inglés, <i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motifs</i>)
JNK	c-Jun N-terminal quinasa
KIR	Receptores de células asesinas similares a inmunoglobulina (del inglés, <i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i>)
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LAIR	Receptor inhibidor asociado a los leucocitos (del inglés, <i>Leukocyte-Associated Inhibitory Receptor</i>)
LILR	Familia de receptor leucocitario similar a la inmunoglobulina (del inglés, <i>Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor family</i>)
LPS	Lipopolisacárido
LRC	Complejo del receptor leucocitario (del inglés, <i>Leukocyte Receptor Complex</i>)
Lys	Lisina
M	Mujer
MCC	Medio de cultivo cardio-condicionado
MEC	Matriz extracelular
MELD	Modelo para el estadio final de la enfermedad hepática (del inglés, <i>Model for End Stage Liver Disease</i>)
MEOS	Sistema microsómico oxidante de etanol (del inglés <i>microsomal ethanol oxidizing system</i>)
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MICA	Antígeno HLA clase I no clásico relacionado con cadena del gen A (del inglés, <i>MHC class I chain-related gene A</i>)
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NFκB	Factor nuclear κ B
NK	Célula asesina natural (del inglés, <i>Natural Killer</i>)
NKT	Células <i>Natural Killer</i> T
NO_x	Óxido nitrógeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONT	Organización nacional de trasplantes
OPTN	Red de Adquisición y trasplante de órganos (del inglés, <i>Organ Procurement and Transplantation Network: OPTN</i>)
OR	Odds Ratio
P	Presencia
Pb	Pares de bases
PBE	Peritonitis bacteriana espontánea
PCR-SSO	Reacción en cadena de la polimerasa de secuencias específicas de oligonucleótidos (del inglés, <i>polymerase chain reaction- Sequence-Specific Oligonucleotide</i>)
PCR-SSP	Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores de frecuencia específica (del inglés, <i>polymerase chain reaction- Sequence-Specific primers</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PKC	Protein quinasa C
PPAR-α	Receptor activador de peroxisoma proliferativo (del inglés, <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)

R	Antisentido (del inglés, <i>Reverse</i>)
RA	Ácido retinoico
RAE1	Ácido retinoico tempranamente inducible-1 (del inglés, <i>retinoic acid early inducible-1</i>)
RETH	Registro Español de Trasplante hepático
ROS	Especie reactiva de oxígeno
SOCS1	Supresor de la señalización de citoquina 1 (del inglés, <i>suppressor of cytokine signaling 1</i>)
SREBP-1c	Esterol regulador de unión a la proteína 1c (del inglés, <i>Sterol regulatory element-binding protein 1c</i>)
SRTR	Registro científico de receptores de trasplantes (del inglés, <i>Scientific Registry of Transplant Recipients</i>)
SSDH	Succínico semialdehído deshidrogenasa
STAT	Señal de transducción y activación de la transcripción
Taq	Polimerasa recombinante termoestable
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral β
TIPS	Shunt portosistémico intrahepático transyugular
TLR4	Receptor toll-like 4
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TRAIL	Factor relacionado con la apoptosis inducida por ligando (del inglés, <i>factor-related apoptosis-inducing ligand</i>)
UE	Unión europea
UNOS	Red Unida para compartir órganos (del inglés, <i>United Network of Organ Sharing</i>)
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad (del inglés, <i>very low-density lipoprotein</i>)

RESUMEN

RESUMEN

Introducción: En la actualidad, el consumo de alcohol supone un gran problema socioeconómico y sanitario en todo mundo, siendo el principal riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas del hígado. El desarrollo de cirrosis hepática por alcohol es una enfermedad cuya única solución en muchos casos es el trasplante hepático. Los mecanismos implicados su desarrollo incluyen una respuesta inflamatoria mediada por las células NK, entre otras. Las células NK participan en este proceso a través de receptores de membrana como son los receptores KIR, que regulan la respuesta inmune a través de su unión a moléculas de HLA-C.

Objetivo: Conocer las principales indicaciones a trasplante hepático realizados en la Región de Murcia, entre ellas la cirrosis hepática alcohólica, y sus características clínicas y sociodemográficas, así como la influencia de los genes KIR y moléculas HLA-C en su desarrollo.

Pacientes y métodos: Es un estudio observacional, descriptivo longitudinal y retrospectivo. La población del capítulo 1 se compone de 1026 pacientes sometidos a trasplante de hígado en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, entre 1988 y 2013. De estos pacientes se seleccionaron 281 pacientes varones con cirrosis hepática alcohólica para la realización del capítulo 2, de los cuales 213 no asociaban infección viral, y 68 sí la asociaban. Se recogieron una serie de datos clínicos, analíticos y radiológicos, y se determinaron los genes KIR de todos los pacientes trasplantados mediante dos tipos de técnicas de reacción en cadena de polimerasa, además del genotipo KIR y de HLA-C de cada individuo.

Resultados: La muestra del capítulo 1 tuvo una edad media de 51.1 ± 0.38 años, de los cuales el 73% fueron hombres y el 27% mujeres. La indicación a trasplante por cirrosis

alcohólica fue la mayoritaria (38.4%; de los cuales el 76.6% no asociaban virus y el 23.4% sí), seguida cirrosis por virus (24.1%). La supervivencia de la cirrosis alcohólica fue la más alta (81.2% al año), siendo menor en los pacientes con cirrosis alcohólica que asociaban infección viral (74.2% al año). La muestra del capítulo 2 tuvo una edad media de 53.63 ± 0.495 años. Dentro de los parámetros bioquímicos, se observaron valores elevados de bilirrubina total (3.17 ± 0.30 mg/dl). La GOT, GPT y GGT mostraron valores 3 veces superiores a la normalidad, así como la fosfatasa alcalina, que se encontraba muy aumentada en los pacientes con cirrosis alcohólica con infección viral respecto a los que no asociaban virus, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P=0.007$). El INR presentó unos valores medios de 1.44 ± 0.05 , ligeramente superior a los valores normales. La actividad de protombina (%) mostró unos niveles inferiores a los niveles normales (58.93 ± 0.94). El gen KIR2LD2/S2+ estaba aumentado significativamente ($P=0.013$) en la población sana (63.3%) respecto al total de pacientes (53.0%), y el gen KIR2DS5+ se encontraba aumentado de manera significativa ($P=0.033$) en la población de pacientes (35.2%) respecto a la población sana (27%). El análisis de epítopes HLA-C mostró que el número de pacientes sin el ligando C1 estaba significativamente incrementado en la población de pacientes respecto a la población sana ($P=0.007$). El genotipo C2C2 estaba significativamente más elevado en los pacientes (23.5%) que en los controles (15.3%) ($P=0.015$).

Conclusiones: La cirrosis alcohólica es la principal causa de indicación a trasplante, siendo más frecuente en hombres. La ausencia del gen KIR2LD2/S2+ y la presencia del gen KIR2DS5+ puede predisponer al desarrollo de cirrosis alcohólica. El análisis de HLA-C parece indicar que el genotipo C2C2 puede predisponer al desarrollo de cirrosis alcohólica.

ABSTRACT

Introduction: At present, alcohol consumption is a major socioeconomic and health problem worldwide, being the main reason for the development of chronic liver diseases. The development of liver cirrhosis is a disease whose unique solution in many cases is liver transplantation. The mechanisms involved in the development of this disease activate an inflammatory response mediated by the innate immune system through NK cells, and other cells. The mechanisms involved in development include an inflammatory response mediated by NK cells, among others. NK cells participate in this process through membrane receptors such as KIR receptors, which regulate the immune response through the bond of HLA-C molecules.

Objective: To know the main indications to liver transplantation in the Region of Murcia, including alcoholic liver cirrhosis, and main clinical and sociodemographic characteristics, as well as the influence of KIR genes and HLA-C molecules in their development.

Patients and methods: It is an observational, longitudinal and retrospective descriptive study. The population of Chapters 1 was composed of 1026 patients who underwent liver transplantation at the Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca between 1988 and 2013. From these amount, 281 male patients with alcoholic cirrhosis were selected for Chapter 2; from those, 213 did not associate the viral infection, and 68 did associate it. As controls subjects, 319 liver donors were used. A number of clinical, analytical and radiological data were identified and the KIR genes from all transplanted patients were determined by two types of polymer chain reaction techniques, in addition to the KIR and HLA-C genomes of each individual.

Results: The sample of chapter 1 had a mean age of 51.1 ± 0.38 years, from which 73% were men and 27% women. Alcoholic cirrhosis was the most frequent (38.4%; 76.6% no virus associated and 23.4% with virus), followed by virus cirrhosis (24.1%). Survival of alcoholic cirrhosis was the highest (81.2% a year), being lower in patients with alcoholic cirrhosis with virus associated (74.2% a year). The sample of chapter 2 had a mean age of 53.63 ± 0.495 years. Biochemical parameters showed high values of total bilirubin (3.17 ± 0.30 mg / dl). GOT, GPT and GGT showed values 3 times higher than normal, as well as alkaline phosphatase, which was significantly increased in patients with alcoholic cirrhosis with viral infection compared to those who did not associate virus. This difference was statistically significant ($P=0.007$). The INR presented mean values of 1.44 ± 0.05 , slightly higher than normal values. Prothrombin activity (%) showed levels below normal (58.93 ± 0.94). KIR2LD2/S2+ gene was significantly increased ($P=0.013$) in the healthy population (63.3%) compared to the total of patients (53.0%), and KIR2DS5+ gene was significantly increased ($P=0.033$) in patients (35.2%) compared to the healthy population (27%). Analysis of HLA-C epitopes showed that the number of patients without C1 ligand was significantly increased in the patient population relative to the healthy population ($P=0.007$). C2C2 genotype was significantly higher in the patients (23.5%) than in the controls (15.3%) ($P=0.015$).

Conclusions: Alcoholic cirrhosis is the main cause of liver transplantation, being more frequent in men. The absence of KIR2LD2/S2+ gene and the presence of KIR2DS5+ gene may predispose to the development of alcoholic cirrhosis. Analysis of HLA-C seems to indicate that the C2C2 genotype may predispose to the development of alcoholic cirrhosis.

INTRODUCCIÓN

1. BREVE REFERENCIA HISTÓRICA SOBRE EL ALCOHOL

El alcohol etílico es una de las sustancias más consumidas por nuestra sociedad, y miles de años atrás fue utilizada como fuente de agua y calorías, puesto que durante siglos la contaminación bacteriana hacía que el agua no fuera potable. Las bebidas fermentadas eran las más habituales, consumidas por la mayoría de la población de todas las edades, con bajo contenido de alcohol puesto que las levaduras no soportaban concentraciones de alcohol mayores del 16%, y por ello la morbilidad relacionada con el alcohol era limitada. Posteriormente comenzó a ser más común la práctica de la destilación de vino y otras bebidas (alrededor del 1100-1500 antes de cristo [AC]), con el consecuente aumento de morbilidad relacionada con el alcohol (Brunschwig y col., 1500).

El alcohol, por tanto, forma parte de nuestra cultura y actualmente es una droga legal y social. Sus efectos en el organismo son diversos, con efectos beneficiosos o perjudiciales dependiendo de los hábitos de consumo. Existen estudios que demuestran que cantidades moderadas de vino disminuyen el desarrollo de algunas enfermedades, y que puede tener efectos beneficiosos como la disminución de la frecuencia de infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares, cálculos vesiculares, demencia vascular o Alzheimer (Mukamal y col., 2003a; German y col., 2000; Mukamal y col., 2005b; Stampfer y col., 2005). Por el contrario, su consumo excesivo puede llegar a producir daños importantes en los distintos órganos del ser humano (Vasanthi y col., 2012).

2. DEFINICIÓN DE ALCOHOLISMO

La dependencia alcohólica o el alcoholismo se define según los criterios de consenso descritos en el *Manual Diagnóstico y Estadístico* de los trastornos mentales

(DSM-IV, del inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*) como un patrón desadaptativo de consumo de una sustancia que conlleva a un deterioro o malestar clínicamente significativo en un periodo continuado de 12 meses, donde además se deben cumplir 3 o más criterios:

- 1) Tolerancia.
- 2) Síndrome de abstinencia.
- 3) Pérdida de control.
- 4) Negligencia en actividades.
- 5) Reducción de la vida social ocupacional o recreativa (abandono de las fuentes de placer o diversiones).
- 6) Seguir bebiendo pese a las consecuencias.
- 7) Pasar la mayor parte del tiempo bebiendo o intentando conseguir el alcohol o recuperándose de la intoxicación

El alcoholismo supone un serio riesgo para la salud que a menudo conduce a un desarrollo de enfermedades crónicas que afectan al hígado, al corazón o al sistema nervioso.

3. DIAGNÓSTICO DE ALCOHOLISMO

Para el cribado de alcoholismo se utilizan cuestionarios diagnósticos, como el cuestionario CAGE (de la siglas en inglés, *Cuttingdown, Annoyed, Guilt, Eyeopen*, que en español significa, problemas relacionados con la reducción de alcohol, molestarse por las críticas, sentimiento de culpa y consumo de alcohol por la mañana) es uno de los más utilizados (Ewing JA, 1984). Este cuestionario consiste en cuatro preguntas

puntuables (un punto cada una), y dos respuestas positivas indican dependencia alcohólica con una sensibilidad de más del 70% y especificidad de más del 90% (Buchsbaum y col., 1992; Girela y col., 1994). A continuación se exponen las cuatro preguntas del cuestionario CAGE.

PREGUNTAS CUESTIONARIO CAGE	
1.	¿Ha pensado en alguna ocasión que tenía que reducir o dejar la bebida?
2.	¿Le han molestado las observaciones; de su familia, allegados, conocidos, acerca de sus hábitos de bebida?
3.	¿Se ha sentido alguna vez a disgusto o culpable, por su manera de beber?
4.	¿Alguna vez ha tenido que beber a primera hora de la mañana, para sentirse bien y empezar en forma el día?

En general se considera que cuanto mayor es la puntuación, mayor es la dependencia. En la tabla 1 se muestra la puntuación y clasificación del consumo de alcohol.

Tabla 1. Clasificación del consumo de alcohol según la puntuación obtenida de las respuestas al cuestionario CAGE.

0-1 puntos	Bebedor social
2 puntos	Consumo de riesgo
3 puntos	Consumo perjudicial
4 puntos	Dependencia alcohólica

4. CÁLCULO DE LA GRADUACIÓN ALCOHÓLICA

La graduación alcohólica es el porcentaje de alcohol que contiene una bebida y se expresa en grados referidos al contenido de alcohol absoluto en 100 cc.

$$\text{Gramos alcohol} = \frac{\text{Volumen (expresado en cc)} \times \text{graduación} \times 0.8}{100}$$

Para calcular los gramos exactos según esta ecuación, un vaso de cerveza (250 ml) de unos 4.5 grados de alcohol contiene 9 gramos de alcohol, y una copa de vino (200 ml) de 13 grados aportará 21 gramos de alcohol aproximadamente. Cuando decimos que un vino tiene 13 grados, significa que 13 cc de cada 100 cc son de alcohol absoluto (el 13%). En la tabla 2 se observan las siguientes equivalencias aproximadas:

Tabla 2. Equivalencia aproximadas de las consumiciones en unidades y gramos de alcohol puro.

Tipo de bebida (graduación)	Cantidad	Unidades de bebida (UBE)	Gramos
Vino (12°)	1 vaso pequeño o copa	1	10
Cava (11°)	1 copa	1	10
Cerveza (5°)	1 quinto	1	10
Cerveza (5°)	1 mediana (333 ml)	1,5	13
Jerez (20°)	1 copa (50 ml)	1	10
Licor (40°)	1 copa o 1 combinado	2	20
Licor (40°)	1 «carajillo»	1	10

Tabla extraída de Rodríguez-Martos y col., 2005

5. CLASIFICACIÓN DEL CONSUMO DE ALCOHOL

La clasificación del consumo de alcohol se establece en varias categorías según los gramos consumidos: bajo riesgo, consumo de riesgo, consumo perjudicial, y alto riesgo. Para medir el consumo de alcohol, la OMS estableció una unidad de medida, la unidad de bebida estándar (UBE), aunque su valor es diferente entre algunos países. En España 1 UBE son 10 g de alcohol puro, y en Gran Bretaña 1 UBE son 8 g de alcohol puro (Babor y col., 2001). Aunque no existe consenso en su clasificación, en general se considera bebedor de riesgo a aquel que consume más de 28 UBEs por semana en el

caso de los varones y más de 17 UBEs a la semana en las mujeres tal y como se indica en la tabla 3. (Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007).

Tabla 3. Niveles de riesgo en el consumo de alcohol

Nivel de riesgo	Hombre	Mujer
Bajo riesgo	<17 UBE/sem	<11 UBE/sem
Consumo de riesgo*	≥28 UBE/sem (40 gr/día)	≥17 UBE/sem (24 gr/día)
Consumo perjudicial o nocivo**	Presencia de Trastornos relacionados con el Alcohol	
	>60 gr/día	>40 gr/día
Alto riesgo (Dependencia alcohólica)	DSM-IV	
	CIE-10	

Tabla extraída de Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007

El consumo de riesgo también se consideraría en las mujeres embarazadas, menores y personas con actividades, enfermedades y tratamiento que desaconsejan su consumo (Fuente Modificada de Aderson P. Alcohol and primary Health Care. Copenhagen: OMS Regional Publications 1996;64). En la actualidad existe una práctica habitual que también se encuentra dentro del consumo de riesgo, que consiste en la ingesta de gran cantidad de alcohol en poco tiempo (5 ó más bebidas alcohólicas que puedan suponer más de 8 UBEs en una sola ocasión o en un periodo corto de tiempo (horas), al menos una vez al mes). Esta conducta se conoce como «atración» (*binge drinking*), en nuestro país más conocido como botellón entre la gente joven.

En la práctica se tiende a considerar que un consumo regular por encima de los 60 gr/día de etanol en el hombre, o de los 40 gr/día en la mujer, es probable que llegue a provocar las consecuencias adversas características del consumo perjudicial (Agencia Europea de medicamentos, 2010).

6. EPIDEMIOLOGÍA

6.1. Consumo de alcohol a nivel mundial

La región con mayor consumo de alcohol del mundo es el continente Europeo, seguido de Estados Unidos (EEUU). En Europa, el mayor consumo se localiza en Rusia y países limítrofes extracomunitarios, aunque la Unión Europea (UE) le sigue de cerca (Rehm y col., 2005).

La dependencia de alcohol a nivel mundial afecta alrededor del 3.6% de la población comprendida entre los 15 y 64 años, siendo los hombres los más representados con 6.3% de prevalencia, y las mujeres con un 0.9% (Rehm y col., 2009), aunque existen variaciones entre diferentes regiones.

En la figura 1 se muestra la distribución del consumo de alcohol en la población mundial mayor de 15 años.

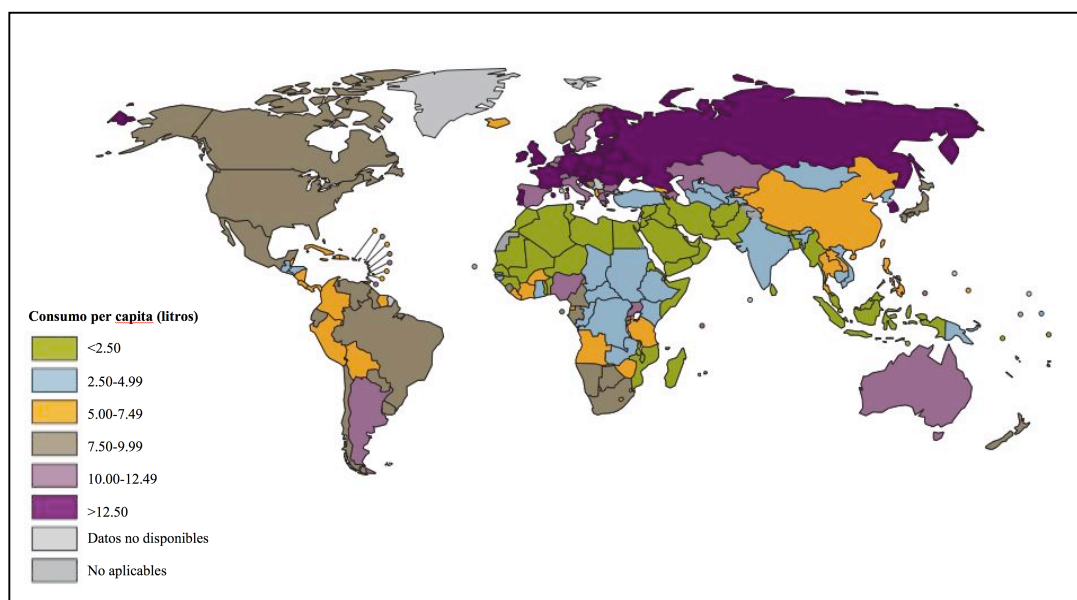


Figura 1. Consumo per capita de la población mayor de 15 años, en litros de alcohol puro, 2005 (Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la situación mundial, 2011).

La mortalidad por dependencia alcohólica es mayor que en la población no consumidora. Los hombres presentan 1.8 veces más riesgo de morir por alcoholismo y las mujeres 3.8 veces más riesgo de mortalidad (Lopez y col., 2006; Organización Mundial de la Salud, 2008). El 3.8% de todas las muertes fueron atribuibles al alcohol (hombres 6.3%; mujeres 1.1%) en todos los grupos de edad en 2004. La diferencia de mortalidad entre sexos está relacionada con las diferencias en el hábito de consumo (Rehm y col., 2009).

6.2. Consumo de alcohol en la Unión Europea

En la Unión Europea (UE) el 88.9% de hombres y el 82.1% de mujeres entre 15 y 64 años son bebedores habituales (total 85.5%); y un 15.3% de hombres y un 3.4% de mujeres en este grupo de edad tienen un consumo de alcohol perjudicial (9.4% en total).

En cuanto al consumo de alto riesgo, el 5.4% de hombres y el 1.5% de mujeres presentan dependencia alcohólica (total 3.5%), siendo el sur de Europa la región con la prevalencia más baja (zona del Mar Mediterráneo) con una tasa de dependencia alcohólica de 1.7% en hombres, y 0.6% en mujeres (Rehm y col., 2013a).

En general el consumo de alcohol es más frecuente en los países nórdicos, los países del centro y este de la UE (Rehm y col., 2005; Rehm y col., 2012), y las diferencias con respecto a otros países como los del sur de Europa (Mediterráneo) residen principalmente en los hábitos o patrones de consumo, con un menor consumo perjudicial (Rehm y col., 2012). Por el contrario, otros países como Suecia con un consumo de alcohol relativamente bajo tienen proporcionalmente un porcentaje mayor de dependencia alcohólica (Rehm y col., 2013a).

En cuanto a la mortalidad en la UE, 1 de cada 7 muertes en hombres y 1 de cada 13 muertes en mujeres son atribuibles al consumo de alcohol, siendo esta mortalidad

debida principalmente al consumo perjudicial y a la dependencia de alcohol (Rehm y col., 2013a).

6.3. Prevalencia del consumo de alcohol en España

La prevalencia del consumo de alcohol en España está ligeramente por encima de la media Europea, aunque los gramos de alcohol *per capita* son algo inferiores. En el año 2005 se estimó que un 3.9% de los hombres y un 0.6% de las mujeres tenían un consumo de riesgo (Rehm y col., 2013b), y un 1.2% de hombres y 0.2% de mujeres mayores de 50 años tenían dependencia alcohólica (Kessler y Col., 2008).

En cuanto a las muertes atribuibles al alcohol en España, están por debajo de la media Europea como se muestra en la figura 2.

En 2004, el 12.3% de la mortalidad en los hombres fue consecuencia del alcohol. En las mujeres este porcentaje fue algo inferior, con un 8.4% en 2004, observando que el 72.2% de estas muertes atribuibles al alcohol, lo fueron por un consumo perjudicial (76.1% hombres; 57.6% mujeres) (Rehm y col., 2013b).

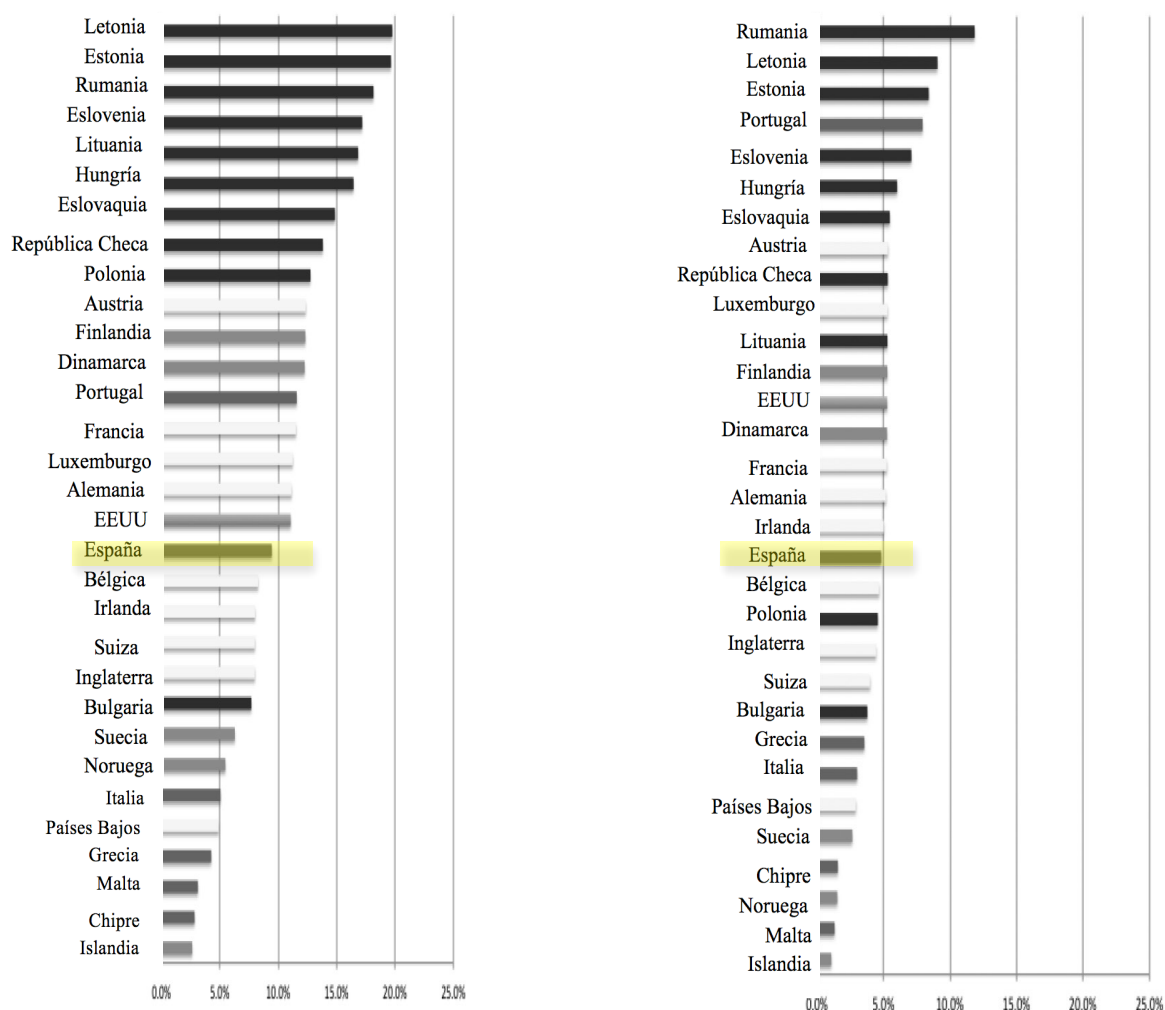


Figura 2. Porcentaje de muertes atribuibles al consumo perjudicial o nocivo (H:>60% gr/día; M: >40 gr/día) según país y sexo (hombres a la izquierda y mujeres a la derecha) (Figura extraída y modificada de Rehm y col., 2013b).

En España los patrones de consumo de alcohol parecen seguir el modelo mediterráneo. Este modelo se basa en un bajo consumo en atracón, siendo mucho más frecuente el consumo durante las comidas, aunque en los últimos años este patrón está cambiando debido a un aumento del consumo perjudicial, sobre todo entre los más jóvenes con una ingesta elevada de alcohol (más de 80 gramos) en un corto periodo de tiempo, habitualmente durante los fines de semana que a menudo lleva a intoxicación, el llamado fenómeno del botellón (Gual A., 2006). Aún así, en España el alcohol se

consume de manera menos perjudicial que en otros países de la UE (Rehm y col., 2013).

España se caracteriza por dedicar mucho tiempo al hábito de beber, aunque existe mucha gente que a partir de cierta edad no consume alcohol por razones de salud. A mediados de 1970 el vino representaba casi el 60% de todo el alcohol consumido, pero tal y como puede observarse en las figuras 3 y 4, la tendencia en las últimas décadas ha cambiado, y actualmente la cerveza es la bebida que más se consume, seguida del vino y los licores, de manera que el consumo de alcohol *per capita* ha disminuido (datos extraídos de la última encuesta de la OMS/Europe and the Global Information System on Alcohol and Health, GISAH, 2012).

CONSUMO DE ALCOHOL

Datos poblacionales (en ≥ 15 años, en litros de alcohol puro)

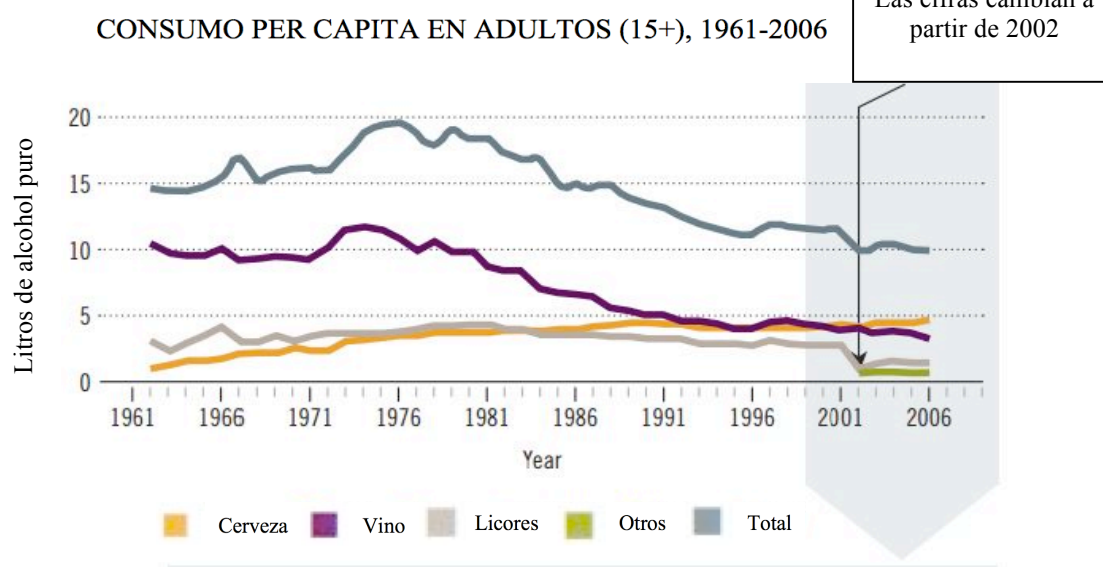


Figura 3. Consumo de litros de alcohol puro *per capita* en mayores de 15 años en España de 1961 a 2006 (OMS, informe sobre la situación mundial, 2011). Se observa como desde el año 2002 el consumo de cerveza aumenta y el de vino disminuye, de manera que también disminuye el consumo total de gramos *per capita*.

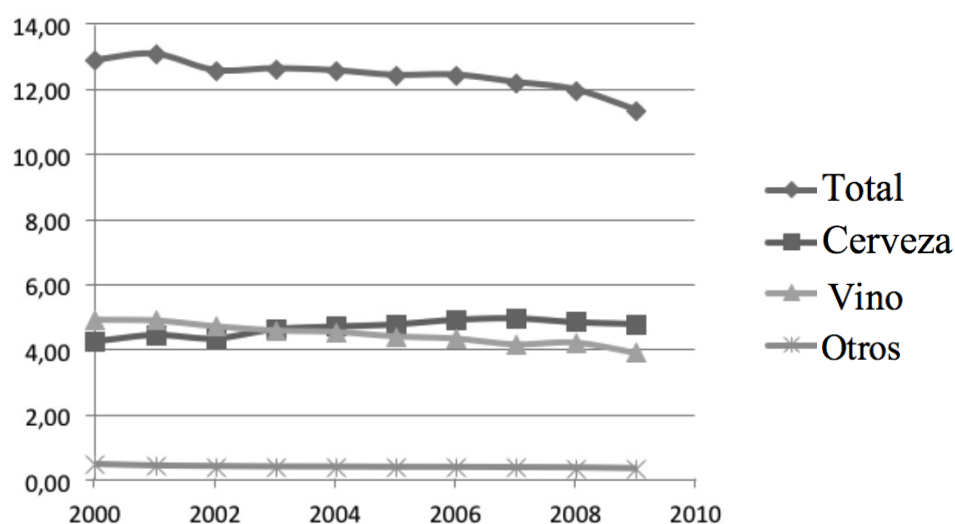


Figura 4. Tendencias registradas sobre el consumo de alcohol en España desde el año 2000 hasta el 2010. En esta figura también se observa que la tendencia del consumo de alcohol está disminuyendo en los últimos años debido a la disminución de la ingesta de vino y al aumento de cerveza (Figura modificada de Rehm y col., 2013).

7. METABOLISMO DEL ALCOHOL

El alcohol o etanol en ayunas se absorbe principalmente en el duodeno y yeyuno debido a su rápido tránsito por el estómago vacío. Cuando se consume etanol con el estómago lleno de comida, hasta el 70% se absorbe directamente a través de las paredes gástricas. La comida sólida y las soluciones hipertónicas retrasan el vaciamiento gástrico por lo que el alcohol permanece más tiempo en el estómago y se absorbe mayor cantidad a este nivel (Cortot y col., 1986). La proporción de etanol consumido está muy influenciada por factores genéticos (Kopun y col., 1977), aunque la causa no está muy clara. Una absorción más lenta del etanol permite un mayor metabolismo de primer paso, en el cual participan las enzimas gástricas de la mucosa intestinal además de las del hígado. El alcohol tras ser ingerido se absorbe y pasa a la circulación portal, de ahí al hígado y a la circulación sistémica (Ammon y col., 1996; Dohmen y col., 1996).

Su metabolización se realiza casi por entero a través de procesos que implican al metabolismo oxidativo del hígado. Son varios los sistemas enzimáticos que intervienen

en la oxidación del etanol a acetaldehído. Entre ellos se encuentran la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema microsómico oxidante de etanol (MEOS) y la catalasa (Mezey y col., 1971; Shigeta y col., 1984). La vía más importante que se encarga del metabolismo del etanol es la vía que en la que interviene la ADH y la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y que se encarga de transformar el etanol en acetato como producto final, tal como puede observarse en la figura 5.

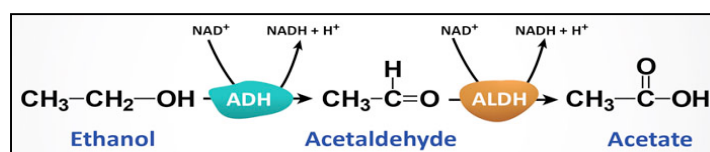


Figura 5. Metabolismo del etanol a través de la ADH y ALDH.

Entre el 2-10% del alcohol ingerido se excreta directamente por los pulmones, por la orina y el sudor, pero la mayor parte se metaboliza en el hígado (Lieber, 2005).

7.1. Vía de la aldehído deshidrogenasa

La ADH tiene diferentes isoformas con diferentes constantes de Michaelis-Menten (K_m) por lo que la velocidad de metabolización puede variar entre individuos (Burnell y col., 1989). La oxidación del etanol mediada por ADH produce acetaldehído e implica la reducción de nicotinamida–adenina-dinucleótido (NAD^+) para formar nicotinamida adenina dinucleótido en estado reducido (NADH), como se indica en la figura 6. El acetaldehído a altas concentraciones inhibe a la ADH mediante un mecanismo de retroalimentación negativa o *feedback* (Crabb y col., 1983).

7.2. Vía del sistema microsómico oxidante de etanol

Existen otros complejos enzimáticos capaces de metabolizar el alcohol, como el sistema microsómico oxidante de etanol (MEOS, del inglés *microsomal ethanol*

oxidizing system) (Shigeta y col., 1984), que se localiza en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos y pertenece la familia de los citocromos microsomaes P-450 por lo que también se le llama citocromo P-450E1 (CYP2E1) (Lieber, 1999).

El MEOS se diferencia de la ADH en varios aspectos. El principal componente oxidante etanólico del MEOS tiene un K_m mucho más alto que la ADH, razón por la que sólo interviene en el metabolismo de etanol cuando las concentraciones son altas, llegando a metabolizar alrededor de un 10% de alcohol.

Su actividad aumenta con la ingesta crónica de etanol debido a que éste produce inducción de esta enzima (Lieber 1999; Joly y col., 1977), por lo que en los bebedores severos crónicos, este complejo enzimático tiene un papel muy importante en lo referente a la tolerancia al etanol. El complejo MEOS metaboliza el etanol a acetaldehído utilizando como cofactor la nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducida (NADPH), y este proceso, además de acetaldehído, da lugar a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$), tal como se esquematiza en la figura 6.

7.3. Vía de la catalasa

La catalasa es otra enzima capaz de metabolizar el etanol, y lo hace utilizando el peróxido de hidrógeno, para obtener acetaldehído y agua, tal como indica la figura 6.

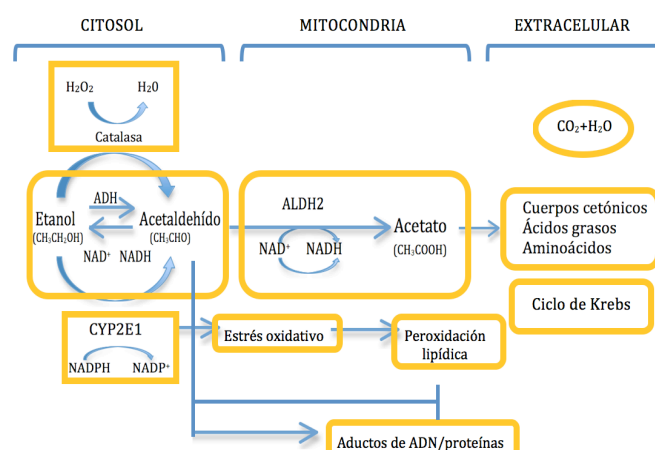


Figura 6. Metabolismo del etanol a través de los tres sistemas enzimáticos principales.

7.4. Vía de la aldehído deshidrogenasa

El siguiente paso es metabolizar el acetaldehído en acetato (obtenido a través de cualquiera de las vías anteriormente citadas). Esta reacción es llevada a cabo gracias a la aldehído deshidrogenasa (ALDH) dentro de la mitocondria, obteniéndose acetato y NADH.

El acetato pasa luego a acetil-CoA, el cual puede ser metabolizado en el ciclo de Krebs o utilizado en la síntesis de ácidos grasos. El acetato no transformado en acetil-CoA pasa a la circulación y luego es metabolizado a CO₂ en el corazón, músculo esquelético y cerebro a través de la vía del ciclo de Krebs. Aunque el acetato no produce hepatotoxicidad directa, se cree que puede regular la respuesta inflamatoria en pacientes con hepatitis alcohólica (Kendrick y col, 2010).

7.5. Polimorfismos de enzimas implicadas en el metabolismo del alcohol

Existen diferentes formas polimórficas de ADH y ALDH y estas diferencias hacen que exista una gran variabilidad en los procesos de biotransformación del etanol de un individuo a otro (Mulligan y col., 2003; Wan YJ y col., 1998). Los diferentes tipos de isoenzimas de ADH y ALDH se diferencian por sus propiedades cinéticas. Los polimorfismos de los genes que codifican dichas enzimas varían entre los diferentes grupos étnicos y pueden estar relacionados con el desarrollo de tolerancia alcohólica. Algunos estudios sugieren que las variaciones en los tipos de ADH y ALDH pueden influir en el tipo de consumo, en el riesgo de alcoholismo y en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el alcohol (Ehlers y col., 2012; 2004; Crabb y col., 1995).

La ADH se codifica en diferentes loci genéticos. Existen cinco genes que codifican las distintas subunidades de la ADH (α , β , γ , π , χ) y la presencia de una y otra subunidad para producir diferentes isoenzimas (ADH1, ADH2, ADH3, ADH4 y ADH5)

que se diferencian en sus propiedades cinéticas, por lo que las tasas de eliminación de un individuo a otro pueden variar (Kitson 1996; Bosron y col., 1986). La ADH2 y ADH3 son las que presentan polimorfismos diferentes. La ADH 2 tiene tres alelos para la subunidad β . El polimorfismo $\beta 1$ de la ADH2 predomina sobre todo en la población de raza blanca y negra, y el polimorfismo $\beta 2$ predomina en los japoneses y chinos. El polimorfismo $\beta 3$ está presente en el 50% de la población negra (Yin S-J y col., 1984; Brunell y col., 1989) y aumenta de manera significativa la tasa de eliminación del alcohol (Thomasson y col., 1995). Respecto al polimorfismo ADH3, tiene dos subunidades, $\gamma 1$ y $\gamma 2$. El alelo $\gamma 1$ predomina en Japón, China y población negra (Yin S-J y col., 1984; Brunell y col., 1989).

La ALDH también presenta varios polimorfismos, siendo la ALDH1 y ALDH2 las encargadas de la oxidación del acetaldehído. La ALDH1 se localiza en el citosol y tiene una alta K_m , y la ALDH2 se localiza en la mitocondria, como se muestra en la figura 7, y presenta una baja K_m . Esta última es la encargada de la mayor parte del metabolismo de etanol en el hígado humano (Jörnvall y col., 1987; Greenfield y col., 1977).

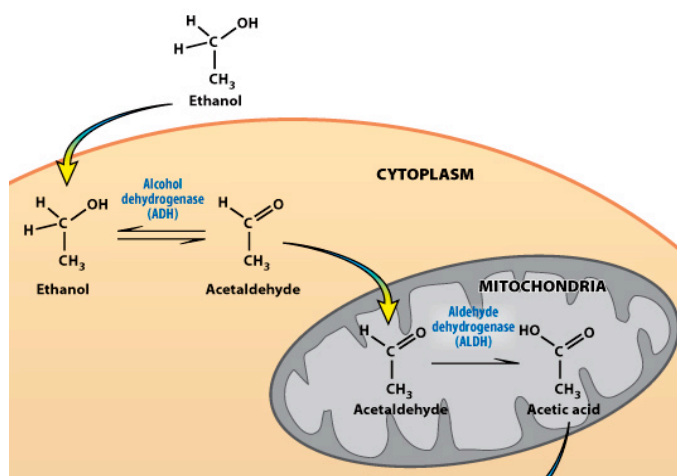


Figura 7. Metabolismo y localización en la célula de la ADH y ALDH2 (Figura extraída de <http://www.rise.duke.edu/a pep/pages/page.html?020409>).

Los diferentes polimorfismos de ADH y ADLH se muestran en la tabla 4 y 5.

Tabla 4. Polimorfismos de ADH con sus subunidades y su distribución según los grupos étnicos.

Clase	Subunidad	Alelo	Americanos blancos	Europeos blancos	Japoneses negros	Americanos negros
I	α	ADH ₁				
I	β_1	ADH ₂ ¹	<95	85	15	85
I	β_2	ADH ₂ ²	<5	15	85	<5
I	β_3	ADH ₂ ³	<5	<5	<5	15
I	γ_1	ADH ₃ ¹	50	60	95	85
I	γ_2	ADH ₃ ²	50	40	5	15
II	π	ADH ₄				
III	χ	ADH ₅				

Tabla modificada de Bosron y Li , 1986.

Tabla 5. Polimorfismos de ADH y ALDH y sus diferentes variantes alélicas.

Enzima	Clase	Locus genético	Variante alélica	Subunidad	K _m (coenzima) (μ M)	K _m (sustrato) (μ M)	V _{mx} (min ⁻¹)
ADH	I	ADH1		$\alpha\alpha$	13	4200	27
			ADH2*1	$\beta_1\beta_1$	7.4	49	9.2
		ADH2	ADH2*2	$\beta_2\beta_2$	180	940	400
			ADH2*3	$\beta_3\beta_3$	710	36000	320
		ADH3	ADH3*1	$\gamma_1\gamma_1$	7.9	1000	87
			ADH3*2	$\gamma_2\gamma_2$	8.7	630	35
	II	ADH4			14	34000	20
	III	ADH5		$\pi\pi$	25	NS	--
	IV	ADH7		$\chi\chi$	260	29000	1500
ALDH	I	ALDH1		$\mu\mu(\sigma\sigma)$	3.9	33	35
	II	ALDH2	ALDH2*1	Tetramero (E ₄)	42	0.20	33
			ALDH2*2	Tetramero (K ₄)	8100	4.6	0.94

Figura modificada de Bosron y Li, 1986.

Existe una variante de la ALDH2 que se considera una variante “deficiente” o inactiva por su escasa actividad oxidativa, de manera que los niveles de acetaldehído aumentan, y con ello su toxicidad, por lo que se producen reacciones de enrojecimiento o “*flushing*” con el consumo de alcohol por vasodilatación capilar, y un aumento de sus efectos tras su ingesta. Alrededor del 50% de los Japoneses y Chinos presentan esta variante de ALDH2, a la cual se le llama ALDH2*2 y es dominante (Higuchi y col., 1995; Crabb y col., 1983). Su presencia está asociada a bajas tasas de consumo de alcohol y sería un factor protector para el desarrollo de alcoholismo. En la tabla 6 se muestra la localización cromosómica de los diferentes polimorfismo de ALDH.

Tabla 6. ALDH y localización cromosómica de sus diferentes polimorfismos. Se resalta la enzima ALDH2, cuya variante es llamada ALDH2*2 y se relaciona con la intolerancia a la ingesta de alcohol.

Gen	Nombre	Localización cromosómica
ALDH1A1	ALDH1	9q21
ALDH1B1	ALDH5	9q13
ALDH1A6	ALDH6	15q26
ALDH2	ALDH2	12q24
ALDH3A1	ALDH3	17p11.2
ALDH3A2	ALDH10	17p11.2
ALDH3B1	ALDH7	11q13
ALDH3B2	ALDH8	11q13
ALDH4A1	ALDH4	1
ALDH5A1	SSDH	6p22
ALDH7A1	ATQ1	5q31
ALDH8A1	ALDH12	6q24.1-25.1
ALDH9A1	ALDH9	1q22-q23

Tabla modificada de Sophos y col., 2001.

ALDH: aldehído deshidrogenasa; ATQ1: antiquitin 1;

SSDH: succínico semialdehído deshidrogenasa

La frecuencia de los alelos ADH2*2, ADH3*1 y ALDH2*2 está disminuida en los pacientes con cirrosis alcohólica (Chao y col., 1994).

8. BENEFICIOS Y ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL ALCOHOL

El alcohol es una droga que provoca efectos negativos en la mayoría de los casos, pero también puede aportar beneficios. Los efectos de su consumo son variados y dependen de la cantidad y el patrón de consumo como se ha comentado anteriormente.

Un consumo moderado de alcohol reduce de forma significativa el riesgo de enfermedades coronarias (Miller y col., 1990; Agarwal y col., 2002; Mukamal y col., 2006) y de una manera menos clara, el riesgo de isquemia cerebrovascular (Mehlig y col., 2008; Orgogozo y col., 1997). Los beneficios atribuibles al alcohol afectan principalmente a los grupos de edad más avanzados (Rehm y col., 2009).

La ingesta moderada de alcohol puede estimular la producción de sustancias antiinflamatorias que afectan a los receptores de adenosina, protein quinasa C, y la óxido nítrico sintetasa, entre otras sustancias cardioprotectoras (Kanno y col., 2000; Sumeray y col., 2000; Albert y col., 2003; Kamada y col., 2004; Gaskin y col., 2007). En más de la mitad de los estudios realizados se ha demostrado la reducción significativa en el riesgo del desarrollo de deterioro cognitivo, demencia o Alzheimer en aquellas personas con un consumo moderado, no así en el consumo perjudicial.

Por otro lado, el consumo de alcohol en cantidades superiores (>25 g/día) está relacionado con el desarrollo de ciertas patologías, tales como la hipertensión y la arteriosclerosis (Marques-Vida y col., 2001; Pletcher y col., 2005), ictus, arritmias e infartos (Hillbom y col., 1998; Biyik y col., 2006).

En general, las enfermedades con más riesgo de desarrollo por ingesta de alcohol son la cirrosis hepática, el cáncer del tracto respiratorio y digestivo superior, el ictus hemorrágico y lesiones por agresión. El cáncer colorrectal, de hígado, de mama, la hipertensión esencial y la pancreatitis crónica también están asociados aunque de manera menos significativa. En cambio, a pesar de las creencias no se ha visto asociación en el desarrollo de úlcera gástrica o duodenal (Corrao y col., 1999, 2004).

En la tabla 7 se muestran algunas de las patologías relacionadas con el alcohol.

Tabla 7. Patologías relacionadas con el alcohol*

Pancreatitis (aguda y crónica)	Hemorragia digestiva
Cardiomiopatía	Hipertensión
Polineuropatía	Cardiopatía isquémica
Hepatopatía crónica alcohólica	Cáncer orofaríngeo
Miopatía	Cáncer de próstata
Psicosis	Psoriasis
Cáncer de pulmón	Ictus
Epilepsia	Taquiarritmia supraventricular
Cáncer de esófago	

*Datos extraídos de Schwartz y col., 2012

Rehm y col., 2009 realizaron un estudio mediante el cual analizaron las enfermedades atribuibles al alcohol en diferentes países, observando que la mayoría de las muertes causadas por alcohol fueron por cirrosis hepática, por enfermedad cardiovascular, por cáncer y lesiones no intencionadas, tal como se recoge en la tabla 8.

Además, en esta tabla se muestran algunas de las enfermedades en las cuales el alcohol tiene un efecto beneficioso, como la enfermedad cardiovascular (Rehm y col., 2009).

Tabla 8. Muertes atribuibles al alcohol por sexo y causa en el 2004*

	Hombres (%)*	Mujeres (%)*	Total
Enfermedades para las cuales el alcohol tiene un efecto negativo			
Desórdenes maternos y perinatales (baja talla al nacer)	2 (0.1%)	1 (0.3%)	3
Cáncer	377 (18.5%)	111 (25.0%)	487
Diabetes mellitus	0 (0.0%)	0 (0.1%)	0
Enfermedades neuropsiquiátricas	109 (5.4%)	25 (5.7%)	135
Enfermedades cardiovasculares	466 (22.8%)	80 (18.0%)	545
Cirrosis hepática	297 (14.6%)	76 (17.1%)	373
Heridas no intencionadas	556 (27.3%)	110 (24.8%)	666
Heridas intencionadas	232 (11.4%)	40 (9.0%)	272
Efecto negativo total atribuible al alcohol	2039 (100.0%)	443 (100.0%)	2482
Enfermedades para las cuales el alcohol tiene un efecto beneficioso			
Diabetes mellitus	-8 (8.3%)	-4 (3.2%)	-12
Enfermedades cardiovasculares	-88 (91.7%)	-128 (96.8%)	-215
Efecto beneficioso total atribuible al alcohol	-96 (100.0%)	-132 (100.0%)	-227
Muertes netas totales atribuibles al alcohol	1944	311	2255
Muertes totales	31063	27674	58738
% de muertes netas totales atribuibles al alcohol	6.3%	1.1%	3.8%
CRA 2000 (por comparación)	5.6%	0.6%	3.2%
CRA=evaluación comparativa de riesgos. *Los números se han redondeado al millar más cercano. Cero indica menos de 500 muertes atribuibles al alcohol en la categoría de enfermedad. Los porcentajes son de todas las muertes, ya sean causadas o prevenidas por el alcohol.			

*Tabla tomada de Rehm y col., 2009

Debido a que el consumo de alcohol es más prevalente en hombres que en mujeres, las enfermedades relacionadas con el alcohol también son más frecuentes en hombres (Rehm y col., 2009). En cuanto a la influencia del sexo en el desarrollo de ciertas patologías, se ha observado que las mujeres tienen más riesgo de desarrollar algunas enfermedades como la cirrosis, el cáncer de mama, y las neoplasias de la cavidad oral y recto (Corrao y col., 1999).

En la zona Mediterránea se ha observado que entre las patologías con más riesgo de desarrollo figura la cirrosis hepática, al igual que en otras regiones, las neoplasias del tracto respiratorio y digestivo superior o el cáncer de mama (Corrao y col., 1999).

9. GENERALIDADES SOBRE LA CIRROSIS HEPÁTICA ALCOHÓLICA

Existen numerosas causas de enfermedades hepáticas que pueden hacer evolucionar a cirrosis. Las causas más comunes de cirrosis son el alcohol y el virus de la hepatitis C (VHC), aunque existen otras muchas como el virus de la hepatitis B (VHB), el hígado graso no alcohólico (HGNA), la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la hepatitis autoinmune, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la hemocromatosis, y la enfermedad de Wilson entre otras (Heidelbaugh y col., 2006).

9.1. Cirrosis y alcohol

Actualmente la toxicidad por alcohol es la tercera causa de morbilidad más común en el mundo (OMS, informe sobre la situación mundial del consumo del alcohol, 2011). La hepatopatía alcohólica es una de las causas más comunes de cirrosis y es una indicación frecuente de trasplante hepático en Europa y Norteamérica (Red de adquisición y trasplante de órganos (OPTN) y Registro científico de receptores de trasplantes (SRTR), 2011; Registro Europeo de trasplante de hígado (ELTR), 1988-2011, Neuberger y col., 1998).

Las lesiones que el consumo de alcohol puede producir a nivel hepático son muy variadas, desde esteatosis, esteatohepatitis, hepatitis aguda alcohólica, cirrosis hepática hasta carcinoma hepatocelular. Algunas de estas lesiones pueden observarse en la figura 8. Además, existen otro tipo de lesiones como fibrosis perivenular, enfermedad veno-oclusiva, colangitis microscópica y hepatitis crónica activa.

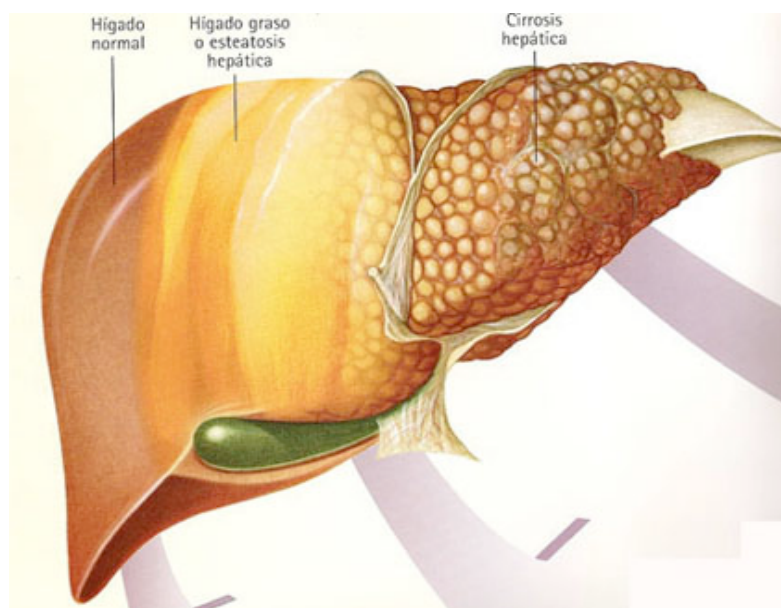


Figura 8. Estadios evolutivos de las diferentes lesiones en el hígado (Figura tomada de <http://consultadigestivo.com/higado-graso-esteatosis-hepatica>).

Según el informe del *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) de 2012 la patología hepática es la causa del 55% de las muertes relacionadas con el alcohol.

9.2. Factores relacionados con el desarrollo de cirrosis alcohólica

La susceptibilidad a los efectos tóxicos del alcohol es diferente de unos individuos a otros, y depende de varios factores, como la cantidad y la duración del consumo, el patrón de ingesta, la obesidad, la coexistencia con virus de la hepatitis y el

sexo. Establecer una relación estricta entre una cantidad determinada de alcohol y el desarrollo de cirrosis alcohólica es muy difícil, puesto que los datos recogidos, tanto en las historias clínicas como del propio paciente, hablan de estimaciones aproximadas y muy generales.

9.2.1. Cantidad y duración del consumo de alcohol

El desarrollo de cirrosis hepática depende tanto de la cantidad como de la duración del consumo de alcohol (Lelbach y col., 1975), aunque la ingesta de alcohol *per se* no parece ser el único determinante de daño hepático.

Algunos estudios hablan de que la ingesta de alcohol durante 10-12 años de dosis mayores de 40-80 gramos al día en los hombres, y de 20-40 gramos al día en las mujeres aumenta el riesgo de desarrollar cirrosis (Becker y col., 1996).

Bellentani y col., 1997 realizaron un estudio en la población italiana, en el que se relacionaba el consumo de alcohol, el patrón de consumo y el riesgo de daño hepático a los dos años de seguimiento, y observaron que este riesgo aumentaba a partir del consumo de más de 30 gramos de alcohol al día. Según este resultado, el 21% de la población estudiada eran individuos de riesgo, y de éstos, el 5.5% mostró signos de daño hepático y el 2.2% desarrolló cirrosis (ratio hombre/mujer 9:1).

9.2.2. Patrón de ingesta

Otros factores como el tipo de bebida y el patrón de ingesta también son importantes. Beber sin comida o beber múltiples tipos de bebida diferentes independientemente de la cantidad de alcohol, aumenta el riesgo de desarrollar patología hepática (Lu y col., 2004; Bellentani y col., 1997). La influencia de la ingesta concomitante de comida junto con la de alcohol está relacionada con el enlentecimiento del vaciamiento gástrico, puesto que aumenta la retención del alcohol en el estómago,

de manera que la ADH gástrica puede contribuir aumentando su eliminación por metabolismo de primer paso en este órgano (Lieber y col., 1994). Además, la ingesta diaria de alcohol tiene más riesgo de causar daño hepático severo que el *consumo en atracón* periódico (Hatton y col., 2009; Wechsler y col., 1998).

9.2.3. Obesidad

La obesidad asociada a la ingesta importante de alcohol también es otro factor que aumenta el riesgo de desarrollar esteatosis hepática (Bellentani y col., 2000). Además, se ha observado que la obesidad por sí sola es un factor de riesgo de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y de hígado graso no alcohólico (HGNA) (Abrams y col., 2004; Boza y col., 2005), y ambas son condiciones que pueden llegar a causar cirrosis (Boza y col., 2005).

9.2.4. Virus de la hepatitis

La coexistencia de virus de la hepatitis C (VHC) y B (VHB), y otras enfermedades como la hemocromatosis, enfermedad de Wilson o esteatosis hepática aumentan también el riesgo de desarrollar cirrosis (Gitto y col, 2009; Clouston y col., 2007; Siu y col, 2009).

9.2.5. Sexo

Las mujeres consumen menos alcohol que los hombres, sin embargo, algunos estudios han sugerido que las mujeres son más sensibles al alcohol que los hombres y tienen más riesgo de desarrollar enfermedades hepáticas para un consumo equivalente en cantidad de alcohol (Becker y col., 1996). Las razones por las que las mujeres son más susceptibles al alcohol quizá incluyan niveles bajos de ADH gástrica, una mayor proporción de grasa en el cuerpo y los efectos de los estrógenos (Frezza y col., 1990).

9.2.6. Edad

El consumo excesivo de alcohol puede darse en personas de todas las edades, sin embargo, el rango de edad de los que ingresan en los hospitales está entre 45-64 años (Adams y col., 1993). Por otro lado, existe un alto porcentaje de personas mayores de 65 años que cumplen criterios determinantes de abuso y dependencia del alcohol (Adams y col., 1992).

9.2.7. Factores genéticos

Existen determinadas condiciones genéticas que parecen vinculadas al riesgo de consumir mayores cantidades de alcohol y desarrollar alcoholismo. Además, existen determinados polimorfismos de la ADH que se han asociado a un mayor consumo de alcohol en las mujeres, como demuestra un estudio realizado en una población mediterránea española sobre la variante Ile349val de la ADH 1C (Francés y col., 2007).

También se ha observado una fuerte asociación entre la alcohol deshidrogenasa clase 1B, beta polipéptido (ADH1B) y la aldehído deshidrogenasa mitocondrial de la familia 2 (ALDH2). Ambos genes son fundamentales para llevar a cabo el metabolismo del alcohol y para disminuir el riesgo de alcoholismo debido a sus propiedades cinéticas (Hurley y Edenberg, 2012).

Un análisis realizado sobre algunas familias incluidas en el *Collaborative study on the Genetics of Alcoholism* (COGA) identificó que los cromosomas 1 y 7 están relacionados con la dependencia alcohólica, ya que algunas regiones de estos cromosomas aparecen aumentadas de manera significativa en personas con alcoholismo (Reich y col., 1998). Otros estudios la relacionan con el receptor de ácido γ -amino butírico A2 (GABRA2) (Fehr y col., 2006; Edenberg y col., 2004) y del gen del receptor muscarínico colinérgico M2, entre otros (CHRM2) (Luo y col., 2005; Wang y col., 2004).

Recientemente, se ha comprobado que existe un componente inmunológico en el desarrollo de la hepatopatía alcohólica (Zetterman y col., 1981). Diversos grupos han investigado el papel de HLA en la susceptibilidad a desarrollar daño hepático por alcohol (Bell y col., 1980; Bron y col., 1982; Monteiro y col., 1988). Así, Bell y col., 1980 determinaron que el HLA-B40 estaba significativamente incrementado en pacientes con cirrosis alcohólica. Otros estudios también muestran un incremento de la frecuencia del antígeno HLA-DR3 y B8 en pacientes con hepatitis alcohólica, lo cual sugiere que el daño hepático por ingesta de alcohol puede estar genéticamente condicionado (Bron y col., 1982). Además, se ha observado que la presencia de HLA A1, A9, A28 y Bw35 se asocia a un mayor riesgo de desarrollar cirrosis inducida por alcohol, mientras que la presencia de HLA B5 se asocia a un menor riesgo de desarrollar cirrosis alcohólica, considerándolo por tanto, factor de protección (Monteiro y col., 1988).

También se ha observado alteraciones en los mecanismos de transducción de señales intracelulares (producción de AMP cíclico) en linfocitos de alcohólicos. Estos niveles de AMP cíclico persisten altos incluso después de la exposición, lo que implicaría una cierta susceptibilidad genética asociada con ciertos genes predisponentes al alcoholismo (Nagy y col., 1988).

10. FISIOPATOLOGÍA Y PROGRESIÓN DE LA HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA CRÓNICA

La enfermedad hepática por alcohol abarca un espectro de lesiones, que van desde la esteatosis, la esteatohepatitis, la fibrosis progresiva, la cirrosis en estadio final y el hepatocarcinoma (Figura 9). Todas estas condiciones no son excluyentes y a

menudo coexisten en el mismo hígado en el transcurso de la enfermedad (Lefkowitz y col., 2005; Méndez-Sánchez y col., 2005).

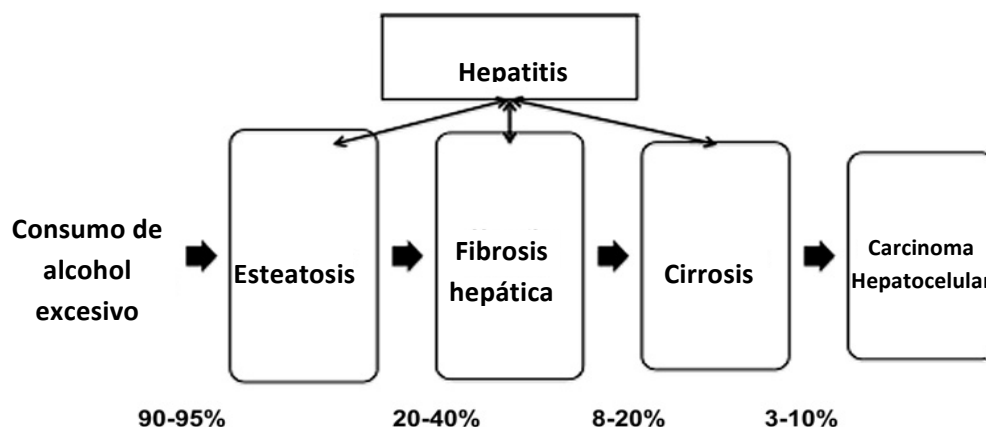


Figura 9. Historia natural de la enfermedad hepática por alcohol (Figura adaptada y modificada de Schwartz y col., 2012)

Hasta un 90% de pacientes con consumo excesivo y daño por alcohol tienen algún grado de esteatosis (Lefkowitz y col., 2005), que suele ser asintomático y reversible con la abstinencia, pero si el consumo persiste, se producirá inflamación con infiltración de leucocitos polimorfonucleares y células NK, con el consiguiente daño hepatocelular (hepatitis alcohólica). Si continua la ingesta de alcohol el daño hepático evolucionará a fibrosis y finalmente cirrosis.

Por lo tanto, es fundamental el cese de la ingesta de alcohol en el manejo de la cirrosis alcohólica, puesto que su consumo persistente es el mayor factor de riesgo para la progresión de la enfermedad (Chedid y col., 1991). Además, la abstinencia es imprescindible para incluir a los pacientes con cirrosis hepática alcohólica en lista de espera de trasplante, por lo que son importantes los programas de rehabilitación y un buen apoyo familiar (O'Shea y col., 2010; Murray y col., 2005).

10.1. Esteatosis hepática

Más del 90% de los pacientes que ingieren más de 60 gramos al día de alcohol desarrollan esteatosis hepática (Crabb y col., 1999), pero también puede desarrollarse en individuos con una ingesta menor de alcohol (Lieber y col., 1965). La esteatosis hepática es una lesión que puede ser reversible si se produce abstinencia de 4 a 6 semanas (Mendenhall y col., 1968) y no es necesariamente precursora de la hepatitis alcohólica (MacSween y col., 1986; Hoyumpa y col., 1975; Edmondson y col., 1967). Sin embargo, a pesar de la abstinencia existe entre un 5-15% de pacientes que progresan a fibrosis y cirrosis (Leevy y col., 1962; Sørensen y col., 1984).

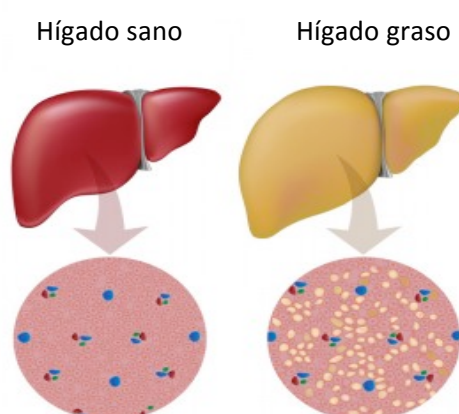


Figura 10. Diferencias entre un hígado sano y un hígado graso (esteatosis hepática).

(Figura extraída y modificada de <http://bocadoslight.com/2013/03/07/esteatosis-hepatica-higado-graso-terapia-nutricional/>).

La esteatosis se produce por la movilización de ácidos grasos periféricos que provienen del tejido adiposo y de los quilomicrones de la mucosa intestinal cuando la ingesta de alcohol es aguda (Figura 11). Cuando la ingesta es crónica y prolongada se produce un aumento de la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos en el hígado.

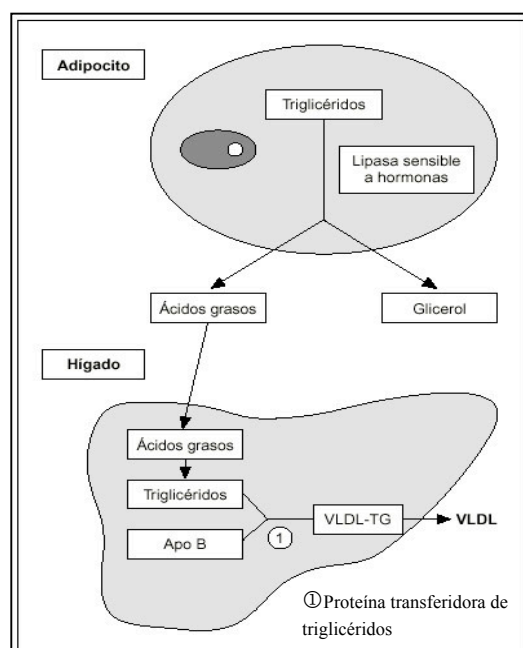
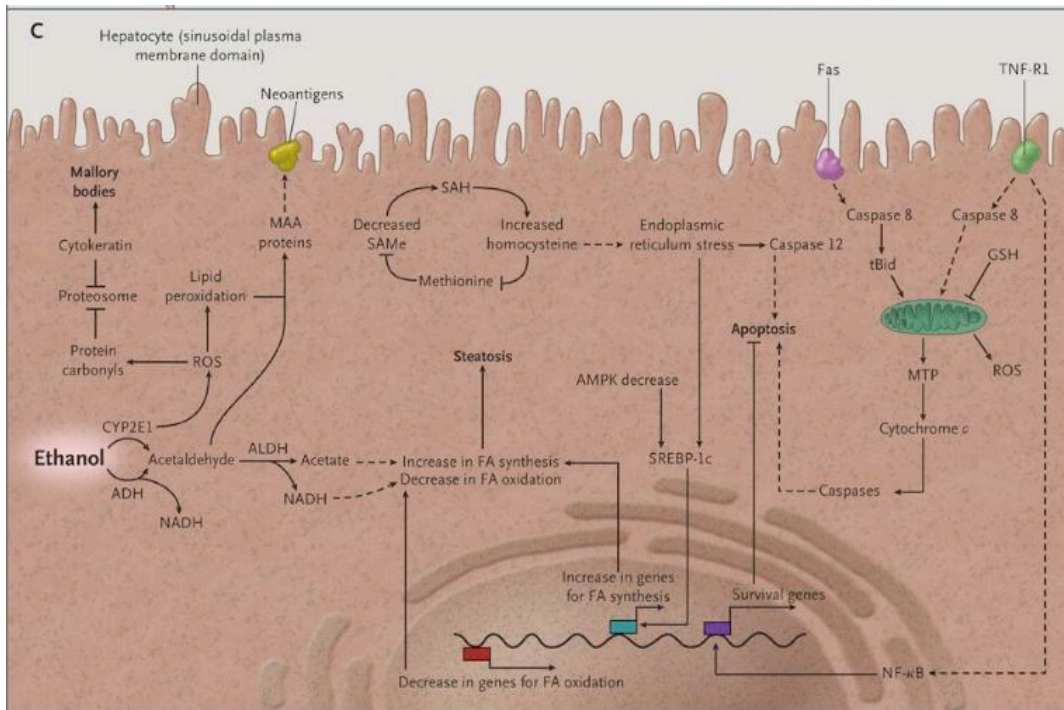


Figura 11. El daño hepático por etanol aumenta la lipogénesis e inhibe la lipólisis, produciéndose de manera secundaria aumento de VLDL (Figura extraída de Bonet Serra y col., 2002).

En este caso se produce un aumento de la lipogénesis y se inhibe la lipólisis, produciéndose daño en la mitocondria y en los microtúbulos, y como consecuencia se acumula lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Sozio y col., 2010; Sozio y col., 2008; Lieber y col., 2005; Baraona y col., 1979). Estos mecanismos pueden observarse en la figura 11 y 12. Los cambios en el potencial de reducción-oxidación de NADH en el hígado podrían promover la lipogénesis a través de la inhibición de la oxidación de ácido grasos (lipólisis). Además, se produce una disminución de la oxidación de los



Los mecanismos a través de los cuales se produce la esteatohepatitis son diversos. El acetaldehído producto del metabolismo del etanol es extremadamente tóxico y reactivo, por lo que interactúa con algunas proteínas y con el ADN formando aductos (Svegliati-Baroni y col, 1994), como puede observarse en la figura 13. De esta manera se altera la producción, estructura y función de las proteínas, produciéndose en algunos casos inactivación enzimática. Además, el consumo de alcohol produce la disminución de compuestos con propiedades antioxidantes como el glutatión por lo que se favorece el estrés oxidativo y la apoptosis (Zhou y col., 2001; Román y col., 1999).

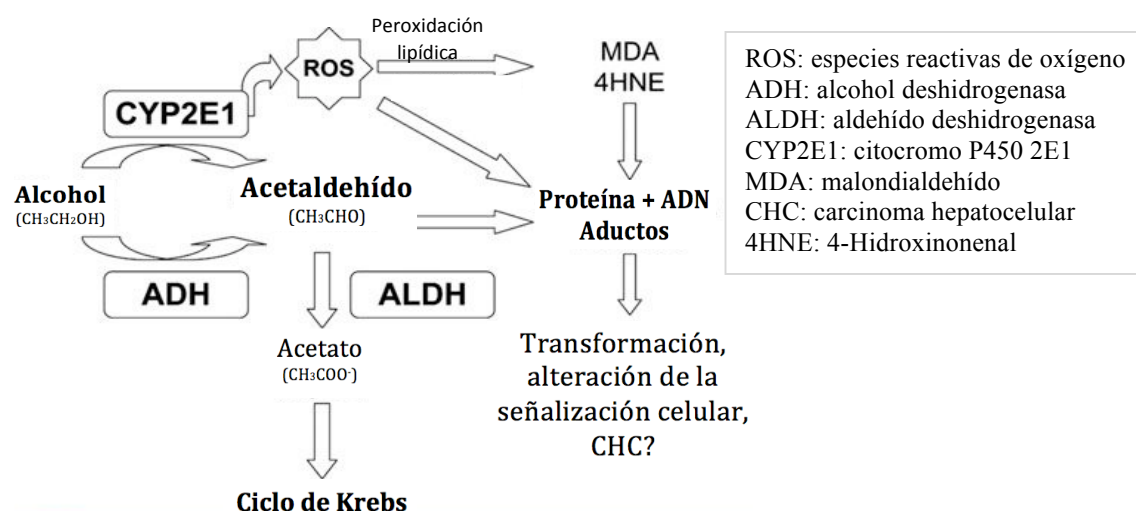


Figura 13. Formación de aductos debido a la interacción de las proteínas y el ADN con el acetaldehído producto del metabolismo del etanol.

La formación de radicales libres de oxígeno (ROS) por parte de la mitocondria es nocivos para el organismo, pues promueve la peroxidación lipídica, la inactivación de enzimas o los cambios en el ADN, aunque existen antioxidantes que los neutralizan.

Como se observa en la figura 14, la ingesta de etanol altera el estado red-ox del hepatocito, promueve una mayor producción de radicales libres por parte del CYP2E1, de manera que hay una sobreproducción de ROS por lo que las reservas de antioxidantes se consumen y como consecuencia se produce estrés oxidativo y daño celular (Lieber, 2005; Wu y col., 2003; Bailey y col., 1998).

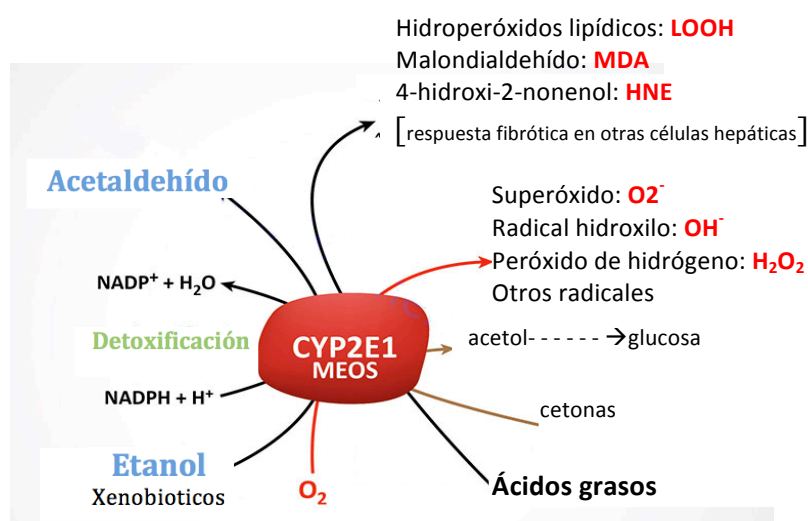


Figura 14. Metabolismo del etanol a través de CYP2E1, que produce sobreproducción de ROS (superóxido, radicales libres, y peróxido de hidrógeno entre otros) los cuales interactúan con los antioxidantes disminuyendo su presencia en la célula, de manera que se favorece el estrés oxidativo y el daño celular, además de alterar la β-oxidación de los ácidos grasos (Figura extraída de <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/ethanol-metabolism-sp.php>).

Además, se producen alteraciones en los mecanismos de autofagia produciéndose inclusiones hepáticas de agregados de citoqueratina (cuerpos hialinos de Mallory) (Donohue y col., 2007), como muestra la figura 15.

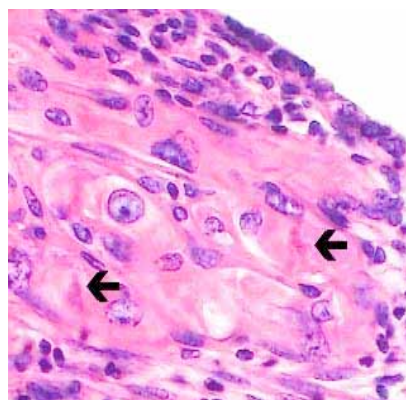


Figura 15. Imagen de los cuerpos hialinos de Mallory obtenida por microscopía óptica. Los cuerpos hialinos de Mallory son indicados mediante flechas.

El abuso de alcohol también produce cambios en la microbiota a nivel de colon de manera que aumenta la permeabilidad intestinal a algunas endotoxinas bacterianas, y esto produce un aumento de lipopolisacáridos (LPS), los cuales inducen una respuesta inflamatoria por parte de las células de Kupffer con la consiguiente infiltración de leucocitos polimorfonucleares (Wheeler y col., 2003), tal como se muestra en la figura 16.

10.3. Fibrosis hepática

La fibrosis es la consecuencia de ingesta mantenida de alcohol a lo largo del tiempo, y precede a la cirrosis (Worner y col., 1985). Se caracteriza por una alteración en el remodelamiento de la matriz extracelular.

El desarrollo de fibrosis está estrechamente ligado a la actividad de varias células, entre ellas las células estrelladas, que son las principales productoras de colágeno tipo I, además de los fibroblastos (Vera y col., 2006). Se cree que el acetaldehído producto del metabolismo del alcohol puede activar directamente a la célula estrellada, pero también existen otros mecanismos implicados en su activación,

como el daño mitocondrial, la alteración de proteínas y fosfolípidos, la hipoxia, la activación de las células de Kupffer, la producción de citoquinas como $\text{TNF}\alpha$ y $\text{TGF-}\beta$, la producción de endotoxinas que elevan los LPS (que a su vez activan al TLR4 y estimulan a las células de Kupffer) o el aumento de ROS (Friedman y col., 1999a; Gao y col., 2011; Vera y col., 2006; Siegmund y col., 2005). Todos estos mecanismos pueden observarse en la figura 16A y figura 16B.

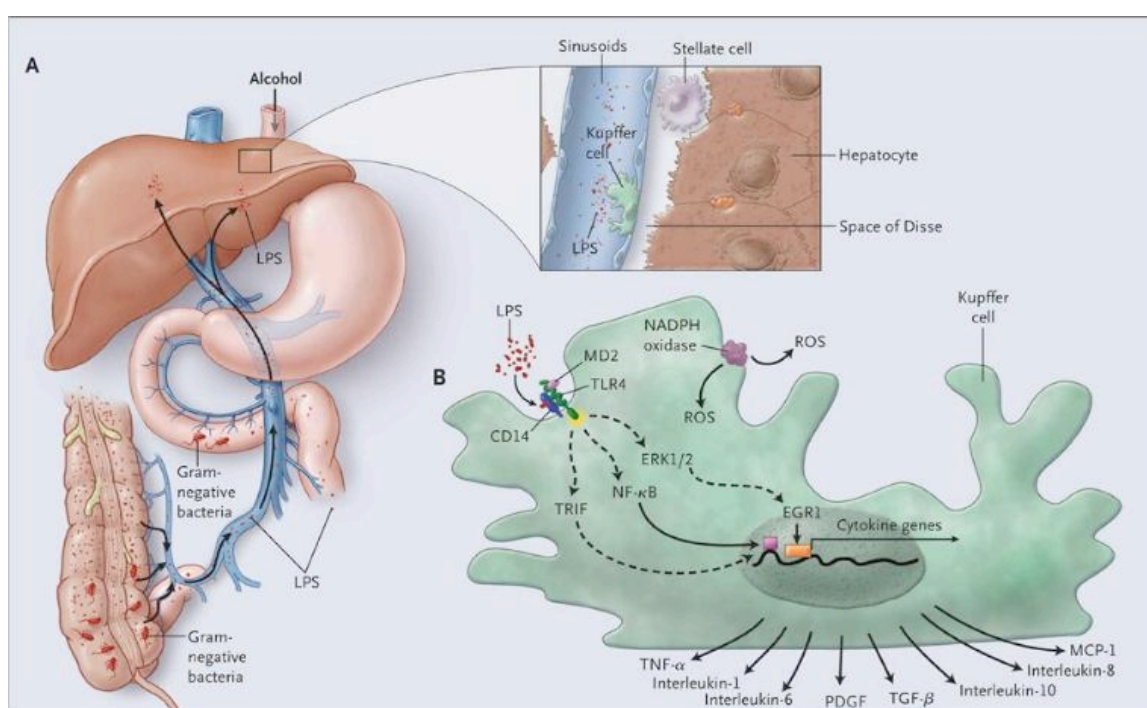


Figura 16. Mecanismos moleculares y celulares implicados en el desarrollo de fibrosis, como el aumento de LPS y la activación de la célula de Kupffer y la célula estrellada (Figura tomada de www.elrincondelamedicinainterna.com).

16A. Absorción de LPS a nivel intestinal. Las bacterias gram negativas del intestino producen LPS. El consumo de alcohol produce alteración en la permeabilidad intestinal, por lo que estos LPS pasan al torrente circulatorio hasta llegar al hígado donde interactúan con las células de Kupffer, e inducen su activación.

16B. Esquema de la célula de Kupffer donde se muestran los diferentes mecanismos de señalización intracelular. Su activación está mediada por varios factores, entre ellos la presencia de ROS y de LPS que activa al TLR4. Una vez activada, la célula de Kupffer produce una serie de citoquinas como $\text{TNF}\alpha$ y $\text{TGF}\beta$ induciendo una respuesta inflamatoria.

10.4. Cirrosis hepática

La cirrosis es el estadio final de la hepatopatía alcohólica. Si la ingesta de alcohol persiste, los mecanismos comentados previamente se pondrán en marcha, y la fibrosis progresará, produciéndose una alteración difusa de la arquitectura hepática por la existencia de necrosis, fibrosis y nódulos de regeneración (Ampurdanés y col., 2002; Lefkowitz, 2005).

El hígado cirrótico es un hígado pétreo y con una reducción de la masa funcional, lo que condiciona la clínica y las complicaciones de la cirrosis. Como consecuencia de estas alteraciones, existe una alteración vascular intrahepática que produce hipertensión portal, y además una pérdida de sus funciones. Otra complicación, aunque menos frecuente, es la aparición de carcinoma hepatocelular sobre hígado cirrótico (Mayans y col., 1990; Chiesa y col., 2000). En la figura 17 se muestra el espectro de lesiones hepáticas por alcohol.

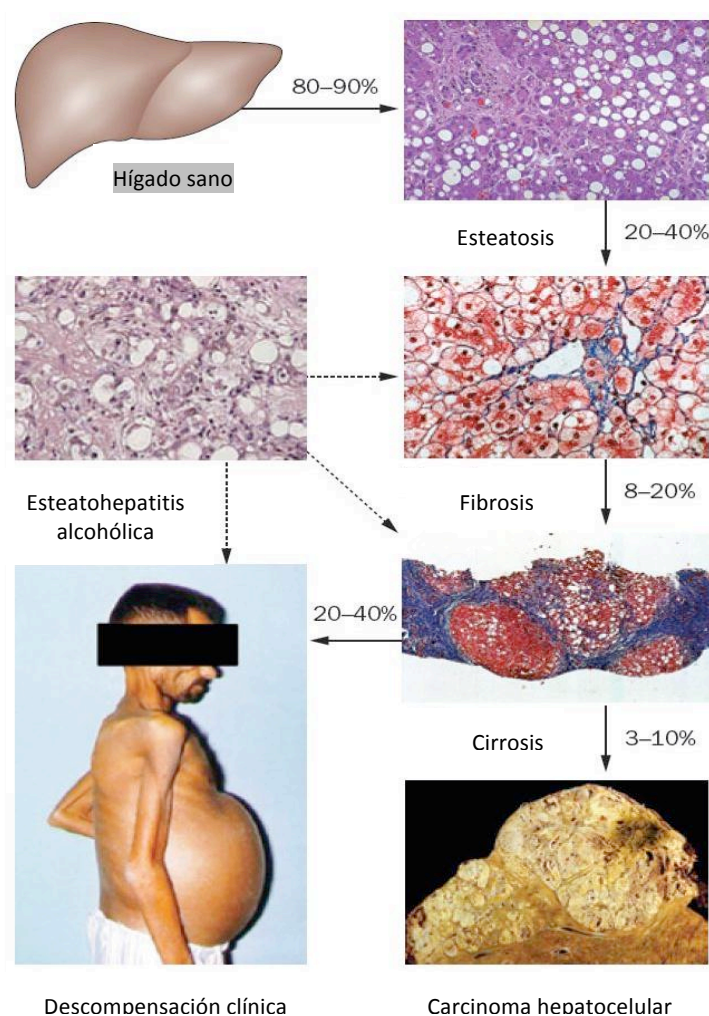


Figura 17. Espectro de enfermedad hepática por alcohol. Los porcentajes representan los pacientes que progresan de un estadio a otro (Figura extraída de Altamirano y col., 2011).

11. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y COMPLICACIONES DE LA CIRROSIS HEPÁTICA

Cuando la enfermedad hepática evoluciona a cirrosis, existe una primera etapa en la que no suelen existir síntomas. Es la llamada fase de *cirrosis compensada*, donde el organismo intenta compensar las alteraciones que se producen tanto a nivel hemodinámico como funcional. Los pacientes en esta fase pueden estar asintomáticos o

presentar síntomas inespecíficos como astenia, pérdida de peso, anorexia y debilidad, por lo que el diagnóstico a veces es casual, por pruebas de imagen o de laboratorio, o al descubrir durante la exploración física una hepatomegalia.

El pronóstico en esta fase es relativamente bueno, y la supervivencia a los 5 años puede llegar hasta el 90% (Bruguera y col., 2001; Bernal y col., 2012).

La segunda etapa se caracteriza por una fase clínica rápidamente progresiva con aparición de complicaciones. Hablamos en este caso de *cirrosis descompensada*, que se asocia a un mal pronóstico, con una tasa de supervivencia del 85% al año y del 56% a los cinco años. Esta fase se da aproximadamente en el 50 % de los pacientes a los 10 años del diagnóstico de cirrosis (Ginés y col., 1987).

Como se muestra en la figura 18, el aumento de la resistencia vascular hepática secundaria a la distorsión de la arquitectura hepática, produce alteración de la circulación portal, lo cual da lugar a hipertensión portal (aumento del gradiente de presión entre la vena porta y la vena suprahepática o cava inferior), y de manera secundaria se produce vasodilatación esplácnica (Bernal y col., 2012). Este fenómeno produce una circulación hiperdinámica (Hernández-Guerra y col., 2005; Arroyo y col., 1993; 2002).

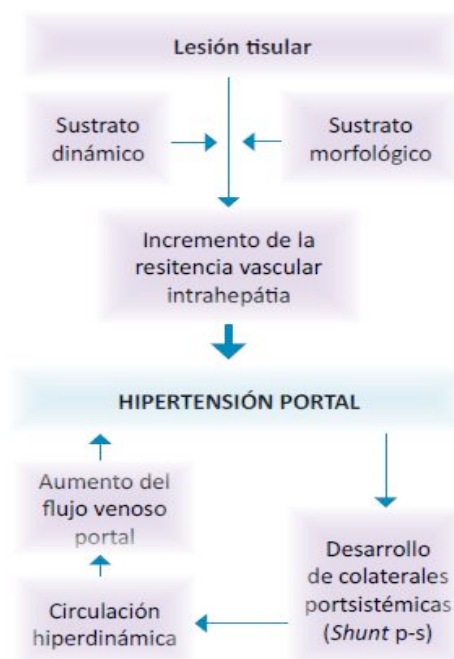


Figura 18. Factores implicados en la hipertensión portal en la cirrosis hepática (Figura extraída de Bernal y col., 2012).

Además, se desarrollan vasos colaterales (*shunt* portosistémico), entre ellos las *varices esofágicas* (García-Tsao y col., 1985; Merli y col., 2003; Zoli y col., 2000), tal como puede observarse en la figura 19, de manera que se deriva parte del flujo esplácnico hacia la circulación sistémica.

Otra manifestación de la hipertensión portal es la descompensación hidrópica o *ascitis* (Figura 20), que consiste en la acumulación de líquido en el espacio peritoneal, edemas e incluso derrame pleural. La ascitis se produce por retención de agua y sodio (por aumento de la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona), debido a una disminución del volumen arterial efectivo a consecuencia de la vasodilatación del territorio esplácnico (Arroyo y col., 1993; 2003; Schrier y col., 1998).

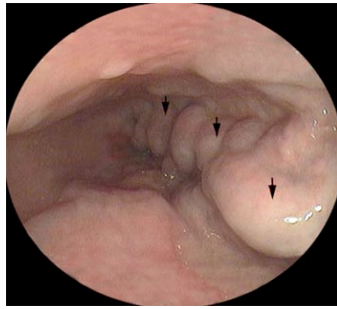


Figura 19. Varices esofágicas. Son secundarias al aumento de la presión portal que produce formación de vasos colaterales (shunt portosistémico).



Figura 20. Ascitis en paciente con cirrosis hepática. Se observa la distensión abdominal por presencia de líquido en espacio peritoneal, y hernia umbilical secundaria al aumento de presión intraabdominal.

La hipertensión portal produce vasodilatación del territorio esplénico, con aumento del flujo sanguíneo al bazo dando lugar a esplenomegalia e hiperesplenismo. El hiperesplenismo produce de manera secundaria, anemia, leucopenia y trombocitopenia (Peck-Radosavljevic y col., 2001; Moschcowitz y col., 1948).

Por otro lado, la pérdida de las funciones del hígado a consecuencia del daño producido por el etanol, puede llegar a producir ictericia, hipoalbuminemia y disminución de los factores de coagulación.

Otra manifestación clínica, consecuencia tanto del daño parenquimatoso como de la hipertensión portal, es el aumento del amonio producido por parte de las bacterias intestinales, que producirá toxicidad cerebral, dando lugar a un cuadro neurológico llamado encefalopatía hepática (Vince y col., 1980; Cordoba y col., 1996; Cordoba, 2011).

Las manifestaciones más importantes de la fase descompensada de la cirrosis son las recogidas en la figura 21 y tabla 9.

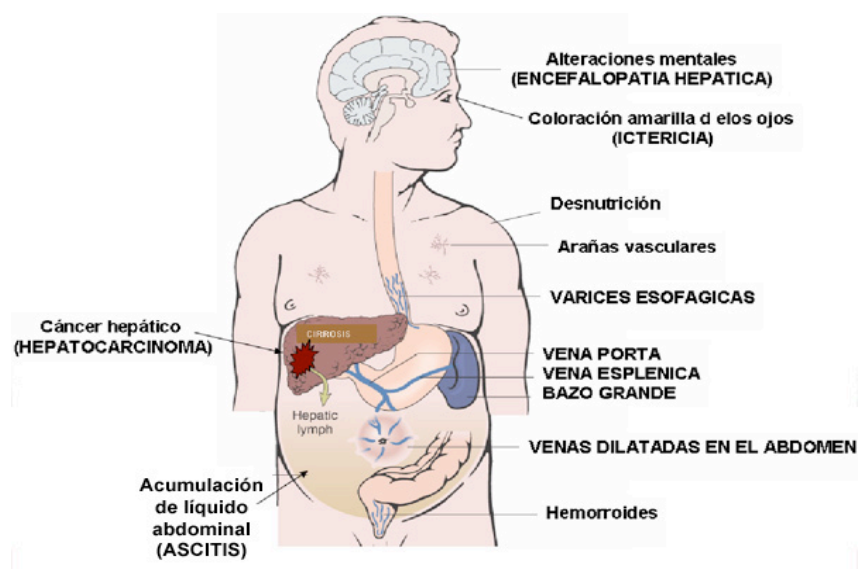


Figura 21. Manifestaciones clínicas más importantes de la cirrosis hepática (Imagen extraída de <http://www.higadograso.cl/info-higado-graso.htm>.)

Tabla 9. Esquema de las manifestaciones clínicas de la cirrosis hepática y sus complicaciones.

- ✓ **Varices esofágicas**, que pueden sangrar produciendo hemorragia digestiva alta.
- ✓ **Ascitis**, que puede complicarse con infección de líquido ascítico dando lugar a peritonitis bacteriana espontánea (PBE) secundaria a traslocación bacteriana (paso al torrente sanguíneo de las bacterias que hay a nivel intestinal) (Jarcuska y col., 2004).
- ✓ **Encefalopatía**, favorecida por el shunt portosistémico y la insuficiencia hepática, que suele ser reversible con tratamiento, y en la mayoría de las ocasiones se puede determinar un precipitante.
- ✓ **Pancitopenia, coagulopatía e hipoalbuminemia.**
- ✓ Aumento del riesgo de infecciones, entre ellas la **peritonitis bacteriana espontánea** (PBE) (Lule, 2004; Garcia-Tsao y col., 2004).
- ✓ **Síndrome hepatorenal**, que consiste en un fallo renal agudo por una vasoconstricción renal intensa (estado prerrenal), secundario a una potente activación de los mecanismos que se ponen en marcha debido a la hipertensión portal y vasodilatación esplácnica (Møller y col., 2005; Arroyo y col., 2008).
- ✓ A la exploración física podemos encontrar una serie de signos como arañas vasculares, eritema palmar, ginecomastia, hepatomegalia y esplenomegalia, ictericia, equimosis, contractura de Dupuytren y asterixis entre otras (Bosch y col., 2002; Yee y col., 2002).

12. DIAGNÓSTICO DE LA CIRROSIS HEPÁTICA ALCOHÓLICA

El diagnóstico de la cirrosis hepática alcohólica se realiza teniendo en cuenta tanto la anamnesis y la exploración física, como los parámetros de laboratorio, las pruebas de imagen y la biopsia hepática (Heidelbaugh y col., 2006; Levitsky y col., 2004). En muchas ocasiones puede ser difícil valorar el hábito etanólico porque los pacientes minimizan o niegan el consumo de alcohol.

La mayoría de las ocasiones no existen manifestaciones clínicas en la primera etapa de la cirrosis, o existen síntomas inespecíficos, por lo que el diagnóstico en esta fase de enfermedad compensada suele hacerse de manera casual a raíz de un análisis, de una ecografía o a través de la exploración física. En otras ocasiones, la enfermedad pasa desapercibida hasta que comienza la segunda etapa de cirrosis descompensada, al aparecer las complicaciones descritas previamente (ascitis, hemorragia digestiva alta, encefalopatía, etc.), por lo que ante las manifestaciones clínicas, se realiza una serie de pruebas analíticas y pruebas de imagen dirigidos a confirmar la sospecha de cirrosis, tal y como se describen a continuación.

12.1. Anamnesis y exploración física

Para establecer el diagnóstico de cirrosis alcohólica es muy importante la historia clínica, el antecedente de ingesta de alcohol y los gramos consumidos al día. En la etapa de cirrosis compensada la existencia de síntomas inespecíficos puede ser de ayuda, al igual que en la exploración física, la presencia de estigmas de hepatopatía crónica como las telangiectasias, arañas vasculares, eritema palmar, hepatomegalia o hígado pequeño (en fases avanzadas), esplenomegalia, circulación colateral abdominal o ictericia (Bosch y col., 2002; Yee y col., 2002).

12.2. Pruebas de laboratorio

12.2.1. Parámetros bioquímicos: los parámetros de función hepática que reflejan el grado de insuficiencia existente son la albúmina, el tiempo de protrombina, y la bilirrubina. Las transaminasas y enzimas de colestasis suelen estar alteradas cuando existe daño hepatocelular o afectación de la vía biliar, aunque todos estos parámetros no son específicos (Heidelbaugh y col., 2006; Rosman y col., 1992).

- a) Albúmina: es sintetizada en el hígado, por lo que a medida que la función hepática disminuye, lo hacen también sus niveles (Rothschild y col., 1969; 1980).
- b) Tiempo de protrombina: el hígado sintetiza la mayoría de las proteínas implicadas en la coagulación, por lo que los parámetros de coagulación se ven afectados, con disminución del tiempo y la actividad de protrombina y el aumento del INR (*International normalized ratio*). En la hepatopatía crónica el balance entre hipo e hipercoagulabilidad está alterado (se ven favorecidos los episodios de hemorragia pero también la trombosis). Esta alteración de la coagulación, se ve influenciada además por déficit de vitamina K, y otros factores (Prelipcean y col., 2011; Téllez-Avila y col., 2007).
- c) Bilirrubina: es un pigmento producido por la degradación de la hemoglobina, que además se conjuga en el hígado para formar parte de la bilis y ser almacenada en la vesícula biliar para después ser eliminada a través de las heces. Sus niveles pueden ser normales en la cirrosis compensada, pero a medida que avanza la enfermedad, pueden elevarse de manera gradual (Krzeski y col., 1999; Skude y col., 1977).

- d) Transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) y transaminasa glutámico-pirúvica (GPT): también conocidas como aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), respectivamente. Estas enzimas se elevan cuando existe daño hepatocelular. En la cirrosis hepática pueden estar levemente elevadas, aunque es frecuente que sean normales. Generalmente son usadas como marcadores tempranos de alcoholismo (Dufour y col., 2000; Menon y col., 2001). A pesar de poder estar elevadas en la cirrosis hepática no son útiles para el establecer el pronóstico ni son específicas (Ellis y col., 1978). En el daño hepático por alcohol la relación GOT/GPT suele ser 2:1 (Sorbi y col., 1999; Skude y col., 1977).
- e) Fosfatasa alcalina (FA) y gamma glutamil transpeptidasa (GGT): expresan daño necroinflamatorio o colestasis, respectivamente, por lo que pueden estar elevadas en la cirrosis hepática. La elevación significativa aislada de GGT sugiere alcoholismo activo o inducción enzimática por fármacos aunque tiene poca especificidad (Goldberg y col., 1980; Barouki y col., 1983).

12.2.2. Alteraciones hematológicas: la anemia, la trombocitopenia y la leucopenia son característica de la cirrosis hepática. Estas alteraciones se deben principalmente al hiperesplenismo. La anemia tiene un origen multifactorial, y se produce debido a las pérdidas crónicas de sangre por el tubo digestivo, a la toxicidad por alcohol que produce anemia macrocítica, con aumento del volumen corpuscular medio (Morse y col., 1979) y al déficit de ácido fólico entre otros, además del hiperesplenismo

12.2.3. Globulinas: las gammaglobulinas pueden estar aumentadas en la cirrosis hepática por hipertensión portal, y su elevación se debe a que las bacterias de procedencia intestinal no son fagocitadas por las células de Kupffer, de manera que estimulan al sistema inmune aumentando sus niveles séricos (Triger y col., 1973).

12.3. Pruebas de imagen

12.3.1. Ecografía: en la cirrosis hepática la estructura del hígado es heterogénea y granular por la presencia de nódulos. Los signos que pueden indicar hipertensión portal son la esplenomegalia, una vena porta dilatada (diámetro aumentado), ascitis o circulación colateral. El doppler permite detectar anomalías en el flujo vascular hepático denominado flujo hepatopetal (Di Lelio y col., 1989; Zwiebel y col., 1995).

12.3.2. Elastografía: mide la elasticidad de un tejido utilizando una onda de ultrasonidos y un pulso mecánico de vibración de baja frecuencia. La elastografía transitoria o también conocida con el nombre comercial de Fibroscan® (Figura 22), mide la velocidad de propagación de las ondas a través del hígado, mediante una sonda, tal como se muestra en la figura 23. En los últimos años la elastografía ha permitido detectar el grado de fibrosis hepática, por lo que es muy útil para el diagnóstico no invasivo de la cirrosis (Mendoza y col., 2006).



Figura 22. Fibroscan®. Es una técnica no invasiva que mide el grado de fibrosis hepática sin necesidad de realizar biopsia hepática y se usa de la misma forma que una ecografía.



Figura 23. Sonda emisora-receptora. Emite dos tipos de onda, una pulsátil vibratoria que penetra en el tejido hepático y otra onda de ultrasonidos que capta la velocidad de propagación de la primera onda a través del hígado (Bartres y col., 2013).

12.3.3. Tomografía axial computarizada (TAC) / Resonancia magnética nuclear (RMN): también pueden ser útiles para el diagnóstico de cirrosis pero no se usan de manera habitual.

12.4. Biopsia hepática

Es una prueba invasiva y se utiliza para el diagnóstico de certeza de la cirrosis hepática, aunque en la actualidad debido a su carácter invasivo está indicada sólo en casos puntuales. La presencia de ascitis y alteraciones de la coagulación contraindica en ocasiones su realización percutánea por lo que en estos casos se elige la vía transyugular (Gil y col., 2003). Tiene una alta sensibilidad, pero al ser una técnica muy invasiva no

siempre exenta de complicaciones, su uso es cada vez menor, puesto que existen otros métodos no invasivos como la elastografía útiles para el diagnóstico. Sin embargo, puede ser útil cuando existe duda diagnóstica o para obtener información pronóstica (Levitsky y col., 2004).

12.5. Otros

Existen algunos biomarcadores que indican consumo crónico de alcohol como es la transferrina deficiente en carbohidratos (CDT) (Perez-Carceles y col., 2014; Bortolotti y col., 2006; Litten y col., 1995). Se trata de una proteína que se encarga de transportar el hierro a los tejidos, pero su uso para el diagnóstico tiene limitaciones debido a que la sobrecarga o deficiencia de hierro disminuye su exactitud. Tiende a disminuir cuando la persona consume alcohol de manera activa, y tiene mayor especificidad que otros marcadores (Hock y col., 2005; Meregalli y col., 1995). Es el único marcador aprobado por la FDA como prueba de diagnóstico clínico para la detección de consumo crónico de alcohol.

Existen también marcadores bioquímicos, como el fibrotest, que ayudan a estimar el grado de fibrosis (Mukherjee y col., 2006; Imbert-Bismut y col., 2001).

13. EVALUACIÓN PRONÓSTICA DE LA HEPATOPATÍA CRÓNICA

Existen modelos pronósticos que sirven para averiguar el grado de severidad y supervivencia de los pacientes con cirrosis hepática. Estas escalas son el Child-Pugh y el MELD, y ayudan en la toma de decisiones terapéuticas y de intervención.

13.1. Clasificación de Child-Pugh

La clasificación de Child-Pugh sirve para la estratificación pronóstica en pacientes con cirrosis (Pugh y col., 1973), aunque inicialmente la clasificación servía

para evaluar el riesgo quirúrgico en pacientes cirróticos a los que se les iba a someter a una derivación portosistémica, llamada inicialmente escala de Child-Turcotte (Child y Turcotte, 1964).

Las variables tomadas en cuenta son tres parámetros bioquímicos y dos clínicos (Tabla 10), y a cada uno de ellos se les asigna una puntuación según su valor (Pasqualetti y col., 1992), tal como se recoge en la tabla 11.

Tabla 10. Parámetros utilizados en la clasificación de Child-Pugh

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	Albúmina
	Bilirrubina
	Tiempo de protrombina
PARÁMETROS CLÍNICOS	Ascitis
	Encefalopatía

Tabla 11. Clasificación Child-Pugh, donde se representa la puntuación asignada a cada parámetro considerado*.

Parámetro	1	2	3
Bilirrubina (mg/dl)	≤ 2	2-3	> 3
Albúmina (g/dl)	$> 3,5$	2.8-3,5	$> 3,5$
Tiempo de protrombina			
• Segundos sobre el control	1-3	4-6	> 6
• INR	$< 1,7$	1,8-2,3	$> 2,3$
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada
Encefalopatía	No	Grado I-II	Grado III-IV

*Child y Turcotte., 1984; Pugh y col., 1973

Según el valor de cada parámetro se asigna una puntuación, que va de 5 a 15, y según la puntuación se clasifican en tres categorías de mejor a peor pronóstico:

Child-Pugh A (5-6 puntos)
Child-Pugh B (7-9 puntos)
Child-Pugh C (10-15 puntos)

El estadio A corresponde a una cirrosis compensada, y el estadio C a una cirrosis descompensada, mientras que el estadio B significaría un compromiso funcional significativo del hígado.

Según la puntuación obtenida al realizar la escala de Child-Pugh podremos estimar la supervivencia del paciente cirrótico, de acuerdo al resumen de la tabla 12:

Tabla 12. Supervivencia al cabo de un año y dos años según estadio de Child-Pugh*.

Puntos	Clase	Supervivencia al cabo de 1 año	Supervivencia al cabo de 2 años
5-6	A	100%	85%
7-9	B	80%	57%
10-15	C	45%	35%

*Infante-Rivard y col., 1987

13.2. Escala MELD

El índice *Model for End Stage Liver Disease* (MELD) también sirve para predecir el pronóstico, y tiene en cuenta la bilirrubina, la creatinina y el ratio internacional normalizado (INR), que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{MELD} = 9.6 \times \log_e (\text{creatinine mg/dL}) + 3.8 \times \log_e (\text{bilirubin mg/dL}) + 11.20 \times \log_e (\text{INR}) + 0.64$$

Inicialmente se utilizó para evaluar el pronóstico en pacientes cirróticos a quienes se les realizaba un *shunt* portosistémico intrahepático transyugular (TIPS), evaluando la mortalidad postTIPS a los 3 meses (Malinchoc y col., 2000). Posteriormente, se ha utilizado para valorar la inclusión en lista de espera para un trasplante hepático y priorizar a los pacientes en lista de espera (Wiesner y col., 2003; Wiesner y col., 2001; Freeman y col., 2002).

Un incremento del MELD está asociado a un aumento de la severidad de la disfunción hepática y de mortalidad a los tres meses (Freeman y col., 2002).

La Red Unida para compartir órganos (UNOS; del inglés, *United Network of Organ Sharing*) ha establecido algunas puntualizaciones para el cálculo de la escala MELD: a) los pacientes han sido dializados dos veces dentro de los últimos 7 días el valor de creatinina usado en la fórmula del MELD debe de ser; b) cualquier valor de creatinina menor a 1 debe reemplazarse por 1 en la fórmula para prevenir que existan puntuaciones menores a 0.

La puntuación obtenida a través de la fórmula del MELD predice la mortalidad a los 3 meses (Wiesner y col., 2003), tal como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 13. Mortalidad por cirrosis hepática a los tres meses según puntuación MELD.

PUNTUACIÓN MELD	MORTALIDAD A LOS 3 MESES
40 o más	71.3%
30–39	52.6%
20–29	19.6%
10–19	6.0%
<9	1.9%

14. CIRROSIS HEPÁTICA ALCOHÓLICA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

La prevalencia de infección por VHC en pacientes con historia de abuso de alcohol es significativamente más alta que en la población general (Singal y col., 2012; Takase y col.; 1993). Algunos estudios han observado una prevalencia del 15% del VHC en pacientes hospitalizados con problemas de abuso de alcohol (Tsui y col., 2006). Esta asociación está relacionada con las conductas de alto riesgo que suelen estar presentes en los pacientes alcohólicos, tales como el abuso de drogas por vía parenteral (Galperim y col., 2006; Jiang y col., 1995).

La coexistencia de ambos produce un efecto sinérgico en la progresión de la enfermedad hepática crónica (Monto y col., 2004), principalmente debido a tres factores:

- a) Se acelera la progresión a fibrosis (Poynard y col., 1997).
- b) Se incrementa el riesgo de carcinoma hepatocelular (CHC) (Hassan y col.; 2002; Yamauchi y col., 1993).
- c) Aumenta la mortalidad (Younossi y col., 2013).

La aceleración de la progresión a fibrosis está influida por varios factores: la edad a la que se produce la infección (existiendo mayor progresión en mayores de 40 años), el género masculino, y un consumo de alcohol mayor de 50 gramos al día (Poynard y col., 1997; Ostapowicz y col., 1998).

Una de las teorías es la influencia del alcohol sobre la replicación viral. En algunos estudios se ha observado un aumento de la replicación del VHC ante la presencia de alcohol, y una disminución de la acción del interferón α (INF- α) ante la presencia de metabolismo activo de etanol (McCartney y col., 2008; Zhang y col.,

2003). Otro factor es la influencia del alcohol y el VHC sobre la inmunidad celular del huésped, puesto que el alcohol afecta a la actividad de las células dendríticas y células *Natural Killer* (NK). También se ha observado como el VHC reduce la diferenciación de las células dendríticas, de manera que la inmunidad contra el VHC está disminuida (Aloman y col., 2007; Szabo y col., 2006). Además, el alcohol y el VHC aumentan el estrés oxidativo. El riesgo de desarrollar estrés oxidativo cuando existe una hepatitis crónica por VHC está incrementado con ingestas moderadas de alcohol al día. Ambos de manera sinérgica estimulan la formación de radicales libres y afectan a las defensas antioxidantes (Otani y co., 2005; Rigamonti y col., 2003).

Otro factor puede ser el incremento de las cuasiespecies de VHC (heterogenicidad de las secuencias de ARN del VHC) debido a la presencia de etanol, probablemente por la generación de ROS que incide en el aumento de la tasa de mutación del genoma del VHC, aunque los mecanismos no están bien esclarecidos (Seronello y col., 2007; Sherman y col., 1999).

En cuanto al tratamiento con INF- γ para el VHC, también se ha descrito una menor tasa de respuesta cuando coexisten VHC y alcohol (Ohnishi y col., 1996; Okazaki y col., 1994).

15. TRASPLANTE HEPÁTICO COMO OPCIÓN TERAPEÚTICA DE LA CIRROSIS HEPÁTICA ALCOHÓLICA

Cuando la enfermedad hepática secundaria a la ingesta de alcohol evoluciona, el único tratamiento curativo es el trasplante hepático. El trasplante hepático ha tenido un gran impacto en el manejo de los pacientes en estadio terminal, y es el tratamiento más efectivo tanto para el fallo hepático agudo como el crónico. Los resultados del trasplante

hepático a lo largo de los años han ido mejorando debido a la mejora de las técnicas quirúrgicas y del manejo postoperatorio a corto y largo plazo (Adam y col., 2003).

15.1. Indicaciones generales del trasplante hepático

Las principales indicaciones del trasplante hepáticos en Europa son muchas, desde la hepatitis fulminante, la cirrosis hepática, las enfermedades colestásicas, los tumores primarios y secundarios del hígado, hasta algunas enfermedades metabólicas.

Los datos registrados por el Registro Europeo de trasplante de hígado (ELTR, del inglés, *European Liver Transplant Registry*) hasta 2013, muestran que la cirrosis hepática representa un 57 % de todos los trasplantes. La causa más frecuente de trasplante por cirrosis hepática es la vírica con una frecuencia del 39% de los trasplantes por cirrosis. La segunda causa más frecuente es la cirrosis alcohólica con un 33% de frecuencia, seguida de la cirrosis biliar primaria con un 9% de representación (Adam y col., 2003). El resto de indicaciones son minoritarias (1-8%) entre las que se encuentran la cirrosis autoinmune, cirrosis por alcohol asociado a virus, cirrosis biliar secundaria, cirrosis por causa desconocida, o cirrosis por otras causas. Estos datos están recogidos en la figura 24.

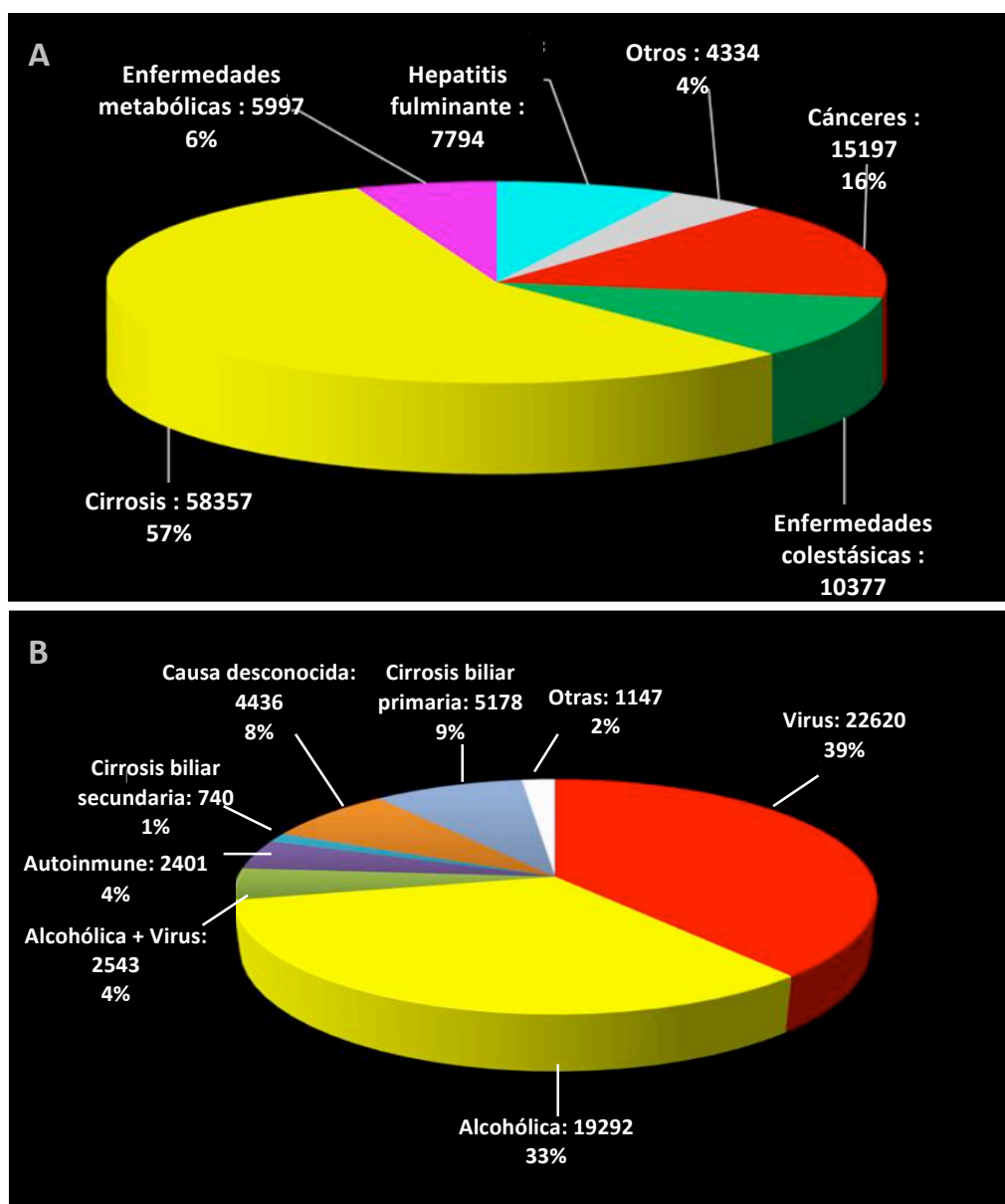


Figura 24. Frecuencia de las principales indicaciones de trasplante hepático en Europa (A), y de cirrosis hepática (B) desde 1988 hasta 2013. (Datos extraídos del ELTR, 2013).

En España las indicaciones de trasplante hepático se distribuyen de manera similar a Europa, siendo la cirrosis alcohólica y la cirrosis por VHC las más frecuentes (Tabla 14).

Tabla 14. Principales indicaciones de trasplante hepático en España*.

DIAGNÓSTICO PRINCIPAL DE LOS RECEPTORES	TOTAL		VIRUS C		
	n	%	Positivo	Negativo	No consta
Cirrosis Alcohólica	5396	30	365	4764	267
Cirrosis por VHC	4408	24.5	4222	-	186
Carcinoma Hepatocelular	3205	17.8	1775	1312	118
Fallo hepático agudo	847	4.7	36	744	67
Cirrosis por VHB	777	4.3	45	692	40
Cirrosis Biliar Primaria	601	3.3	14	557	30
Enf. Biliares Congénitas	634	3.5	3	512	119
Cirrosis Criptogenética	12	0.1	0	12	-
Otras Enf. metabólicas	264	1.5	3	218	43
Cirrosis Autoinmune	262	1.5	5	232	25
Colangitis Esclerosante Primaria	215	1.2	5	193	17
Otras cirrosis virales o mixtas	125	0.7	18	97	10
Otras cirrosis	113	0.6	2	84	27
Amiloidosis Familiar	182	1	1	178	3
Hemocromatosis	77	0.4	7	66	4
Enf. Wilson	72	0.4	1	69	2
Tumores Benignos	133	0.7	5	121	7
Budd Chiari	74	0.4	2	65	7
Cirrosis Biliar Secundaria	72	0.4	2	62	8
Carcinoma tracto Biliar	47	0.3	2	45	-
Hepatitis subaguda	41	0.2	6	26	9
Otros cánceres primarios	65	0.4	0	62	3
Cánceres secundarios	89	0.5	1	83	5
Otras Colestásicas	33	0.2	1	30	2
Carcinoma Colangiocelular	45	0.3	10	34	1
Otros cánceres	13	0.1	2	7	4
Enf. Parasitarias (hidatidosis)	10	0.1	0	9	1
Otras Enf. hepáticas	143	0.8	9	100	34
TOTAL	17966	100	6542	10395	

*Memoria Registro Español de Trasplante Hepático (RETH), 2012.

15.2. Selección de pacientes con cirrosis hepática para trasplante hepático

En ocasiones es difícil decidir quién puede beneficiarse de un trasplante hepático, puesto que el número de receptores supera al de donantes. Aunque la cirrosis

hepática es una buena indicación para trasplante hepático, la opinión pública y muchos profesionales médicos continúan cuestionando su indicación por diferentes motivos, entre ellos, la responsabilidad del propio paciente en el desarrollo de su enfermedad, o la posibilidad de que el receptor vuelva a consumir alcohol tras el trasplante con el consiguiente riesgo de perder el injerto (Neuberger, 2007).

15.2.1. Criterios de inclusión en lista espera

La clasificación de Child-Pugh ha sido usada durante mucho tiempo para decidir quién puede beneficiarse de un trasplante hepático, aunque en los últimos años, se está utilizando también la escala MELD para decidir cuando un paciente debe entrar en lista de espera de trasplante hepático, puesto el Child-Pugh es más subjetivo al incluir parámetros clínicos. El MELD ha sido validado por la UNOS y es utilizado por algunos países para priorizar a los pacientes con enfermedad crónica hepática en lista de espera (Burra y col., 2005). Actualmente, no se dispone de datos para que la clasificación de Child-Pugh deje de utilizarse a favor del sistema MELD, y se recomienda la utilización de ambos modelos (Sociedad Española de Trasplante Hepático, 2008).

Los pacientes con cirrosis hepática deben tener una puntuación Child-Pugh de 7 o más para considerar el trasplante como opción terapéutica, lo que equivaldría a un MELD de 10 (Murray y col., 2005). La aparición de complicaciones en la cirrosis también se asocia a una disminución de la supervivencia importante (Ginés y col., 1987), y por tanto, las recomendaciones para considerar el trasplante hepático son las contenidas en la tabla 15.

Tabla 15. Criterios clínicos de inclusión en lista de espera de trasplante hepático.

Child-Pugh > 7
MELD > 10
Ante la primera complicación mayor de la cirrosis hepática: • Ascitis • Hemorragia digestiva • Encefalopatía hepática • Peritonitis bacteriana espontánea • Síndrome hepatorenal tipo 1 • Carcinoma Hepatocelular

Previamente a la inclusión de los pacientes en lista de espera, se debe realizar un estudio pretrasplante que incluya una evaluación cardiopulmonar (Lentine y col., 2012), una serología completa, descartar infecciones o neoplasias, pruebas de imagen para valorar la arteria hepática y la vena porta, y una evaluación psicosocial (Murray y col., 2005).

15.2.2. Contraindicaciones de trasplante hepático

Existen algunas contraindicaciones, aún en pacientes que cumplen los criterios para trasplante. El consumo activo de alcohol y otras drogas contraindica el trasplante. Es necesaria una abstinencia de alcohol de al menos 6 meses para ser considerado candidato, aunque existe controversia (Beresford y col., 2000; Anand y col., 1997).

La evidencia de enfermedad maligna activa también sería una contraindicación para el trasplante, aunque no hay consenso sobre el intervalo que debe pasar entre la remisión de la neoplasia y el trasplante (Sociedad Española de trasplante hepático, 2008). La enfermedad cardiopulmonar severa implica un riesgo quirúrgico alto, por lo que hay que ser cauto a la hora de indicar el trasplante. La obesidad mórbida debería ser considerada una contraindicación para el trasplante hepático, y los paciente fumadores deberían dejar de fumar (Murray y col., 2005).

En general, no deben trasplantarse pacientes en situación terminal, intubados, con fallo multiorgánico u otras circunstancias que se asocien con una supervivencia estimada postrasplante inferior al 50% a los 5 años. También debería evitarse cuando el MELD es mayor de 25, por la alta mortalidad con la que se asocia. La mayoría de centros usan como límite de edad aproximado los 65 años, aunque en casos muy seleccionados con poca o nula comorbilidad y muy buena salud, también se acepta el trasplante en pacientes de 65-70 años (Sociedad Española de trasplante hepático, 2008).

15.3. Evolución postrasplante hepático

Existen numerosos factores tanto del donante como del receptor que influyen en los resultados del trasplante. La severidad de la enfermedad hepática en el momento del trasplante y las características del donante están relacionados directamente con la supervivencia (Burra y col., 2010).

Uno de los resultados más importantes en el trasplante hepático a lo largo de su evolución es la mejoría de los resultados a largo plazo, con un aumento de la supervivencia. Esta mejoría es más significativa para el hepatocarcinoma (CHC), con un aumento del 17% en la supervivencia a los 5 años desde 1990 hasta el año 2000 (Adam y col., 2003).

Una cuestión importante es si la calidad de vida mejora tras el trasplante en estos pacientes. Diversos estudios han evaluado la calidad de vida tras el trasplante, y se ha observado que aunque el trasplante no permite llevar una vida completamente normal, sí aporta beneficios a la calidad de vida, mejorándola a corto plazo (Pereira y col., 2000; Mejías y col., 1999; Dew y col., 1997), aunque a largo plazo disminuye (Ruppert y col., 2010).

La supervivencia del injerto a un año después del trasplante, a los tres, cinco y diez años es de 84%, 78%, 73% y 58% respectivamente, y significativamente más alta en los pacientes con cirrosis alcohólica que con cirrosis por virus (Adam y col., 2012; Burra y col., 2010). La asociación entre alcohol y VHC disminuye todavía más la supervivencia. No obstante, cuando se comparan las supervivencias entre cirrosis hepática, cáncer hepático y fallo hepático agudo, se observa una mayor supervivencia de la cirrosis con respecto a las otras dos indicaciones (Figura 25).

Burra y col. observaron en 2010 que la supervivencia de los trasplantes por cirrosis alcohólica asociado a VHC comparada con la de la cirrosis alcohólica asociada a VHB es menor en el primer caso, con un 52% vs 64% respectivamente (Burra y col., 2010). Además, el riesgo de perder el injerto es mayor en los trasplantes por VHC (Rowe y col., 2008).

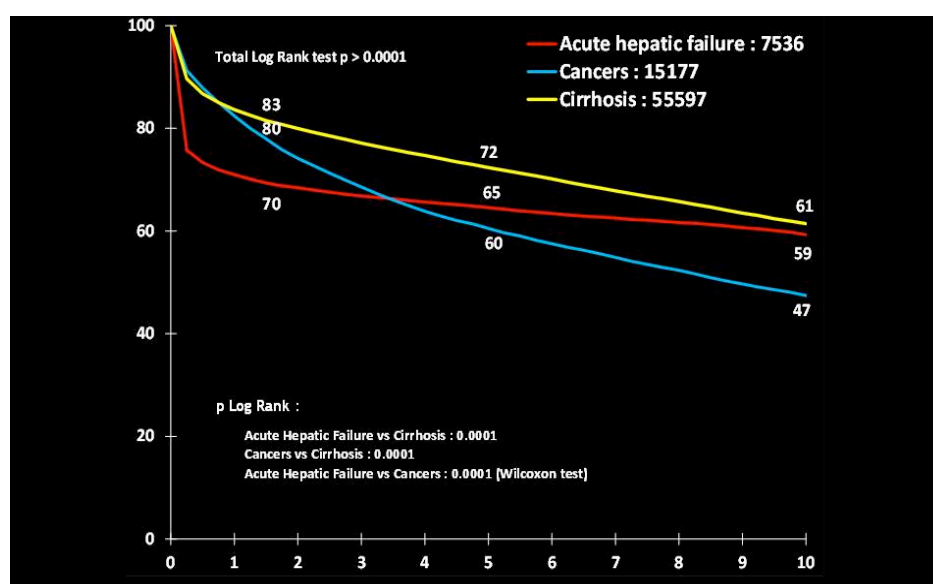


Figura 25. Supervivencia postrasplante hepático según cirrosis, cáncer y fallo hepático agudo, desde 1988-2012. Se observa como la supervivencia a corto y largo plazo es mayor en los trasplantes realizados por cirrosis (ELTR, 2012).

Las principales causas de muerte en los trasplantes por cirrosis alcohólica, es la patología cardiovascular, la aparición de tumores de novo, especialmente del tracto

aerodigestio (Nure y col., 2013; Jiménez y col., 2003; Jain y col., 2000). Por el contrario, la causa más frecuente de muerte o pérdida del injerto en los pacientes trasplantados con cirrosis alcohólica por VHC, es la recurrencia (Burra y col., 2010).

15.3.1. Recaída en el consumo de alcohol

La cirrosis hepática es en todos los casos una buena indicación de trasplante hepático, por la buena supervivencia del injerto a corto y largo plazo. Sin embargo los buenos resultados del trasplante pueden verse afectados cuando se produce recaída en el consumo de alcohol.

Alrededor del 10-50% de los trasplantados por cirrosis alcohólica vuelve a beber a los ocho años de seguimiento, siendo en el 10-15% de los pacientes un consumo perjudicial (Cuadrado y col., 2005; Pageaux y col., 2003; Tome y col., 2003; Mackie y col., 2001). La pérdida del injerto por la recurrencia de la enfermedad relacionada con la recaída en el consumo de alcohol es rara (Rowe y col., 2008; Yusoff y col., 2002), con una tasa de disfunción del injerto por la recaída en torno al 0-17%, y una tasa de muerte del 0-5% (Pageaux y col., 2003; Conjeevaram y col., 1999).

La supervivencia a los 5 años de seguimiento fue similar entre los que recayeron y los que no recayeron (92.9% vs 92.4%, respectivamente), pero a los 10 años, la tasa de supervivencia disminuyó significativamente entre los paciente que recayeron (45.1% vs 83.5%), siendo la causa principal de muerte en estos paciente la patología cardiovascular y los tumores. A pesar de ello, las alteraciones histológicas hepáticas atribuidas al alcohol son leves (Cuadrado y col., 2005), aunque otros autores describen aumento de grasa hepática y fibrosis pericelular en aquellos con un consumo perjudicial (Pageaux y col., 2003; 1999).

Tras el trasplante hepático pueden aparecer una serie de complicaciones, entre ellas las vasculares tales como trombosis de la arteria hepática o vena porta, las complicaciones biliares, la disfunción primaria del injerto o el rechazo del injerto.

16. HÍGADO E INMUNIDAD INNATA

El hígado es un órgano complejo, compuesto mayoritariamente por hepatocitos que realizan diversas funciones, entre ellas, funciones metabólicas y de detoxificación necesarias para el correcto funcionamiento del cuerpo humano, además de actuar como glándula exocrina produciendo bilis, y como glándula endocrina (Guyton y Hall, 2007). El resto de células que componen el hígado son células no parenquimatosas, como las células endoteliales, células estrelladas, células de Kupffer, y linfocitos. Este conjunto de células confiere al hígado una importante capacidad inmunológica, sobretodo parte de la inmunidad innata que actúa como filtro entre el tracto digestivo y el resto del organismo.

Como puede observarse en la figura 26, el hígado recibe el 80% del flujo sanguíneo a través de la vena porta, el cual suministra productos bacterianos, toxinas y antígenos alimenticios. El restante 20% de la vascularización hepática proviene de la arteria hepática (Racanelli y col., 2006).

La inmunidad innata es una importante primera línea de defensa contras las infecciones, respondiendo de manera rápida a la presencia de patógenos. Numerosos datos sugieren que la inmunidad innata está relacionada con la patogénesis de la fibrosis hepática (Pan y col., 2006, Byun y col., 2010).

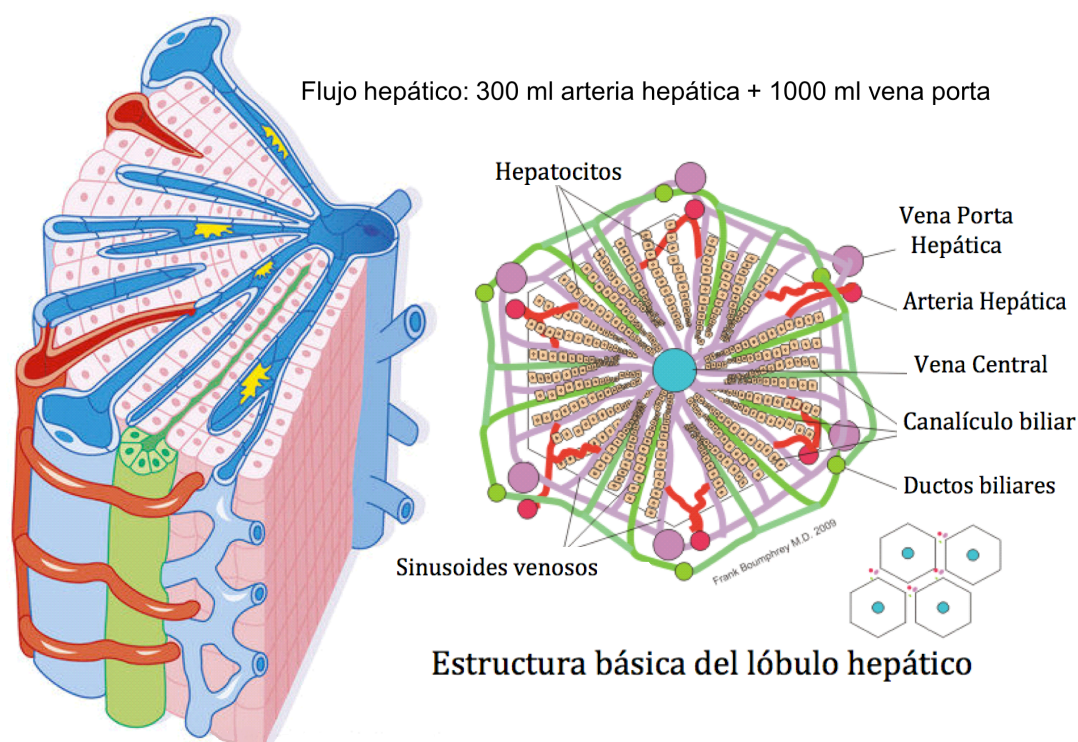


Figura 26. Esquema ilustrativo de la circulación intrahepática. La vena porta aporta el 80% del flujo sanguíneo, en cambio la arteria hepática solo contribuye con un flujo del 20%. Tanto la vena porta como la arteria hepática junto con el conducto biliar constituyen la estructura básica del lobulillo hepático (imagen extraída y modificada de <http://dc221.4shared.com/doc/xbx2XIYB/preview.html>).

17. EFECTO DEL ALCOHOL SOBRE EL SISTEMA INMUNE

El funcionamiento óptimo del sistema inmunitario requiere un grado elevado de interacción regulación entre los diferentes tipos celulares que lo integran. El efecto nocivo del alcohol sobre el sistema inmune puede deberse tanto a una acción directa del alcohol o de sus metabolitos sobre las células inmunitarias como una acción indirecta modificando los mecanismo de interacción intercelular. Ninguno de los dos mecanismo excluye al otro y posiblemente ambos coexisten en la lesión inmunológica asociada al consumo de alcohol.

La administración aguda o crónica de etanol a animales de experimentación produce pérdida de linfocitos del timo, bazo y ganglios. Las células que se pierden incluyen linfocitos B, linfocitos NK, y timocitos, y aunque no se conoce el mecanismo

íntimo de esta pérdida celular se ha sugerido que la apoptosis inducida o agravada por el etanol juega un papel relevante (Ewald y Shao., 1993). De hecho se ha demostrado en estudios *in vitro* que el etanol acelera el proceso de apoptosis en timocitos, y linfocitos B y T del bazo. (Slukvin y col., 1995).

Por otro lado, el alcohol también provoca que los mononucleares, y linfocitos T en particular, presenten menor respuesta proliferativa a la estimulación con agentes inespecíficos o con el receptor de la célula T anti-CD3 (Rosselle y col., 1995; Devière y col., 1988; Mutchnick y col., 1988; Watson y col., 1985), una menor activación de linfocitos T colaboradores (CD4) y alteración en la secreción de citoquinas secretadas por los linfocitos T, así como disminución de linfocitos T en los focos de inflamación (Chiappelli y col., 1995; Cook y col., 1998).

En estudios *in vitro*, se ha observado que la exposición aguda al etanol puede incrementar o disminuir la actividad de las células NK en humanos. Esta actividad depende del momento de la determinación, si se realiza en el momento de la exposición al etanol o posteriormente (Li y col., 1997).

En voluntarios sanos a los que se les administró una dosis aguda de etanol no se les detectó cambios en la actividad NK (Li y col., 1997). Por otro lado la actividad de las células NK obtenidas de alcohólicos crónicos puede ser normal siempre que exista hepatopatía asociada. Si no existe hepatopatía crónica etanólica, la actividad de las células NK tiende a estar disminuida (Cook y col., 1997) o claramente suprimida (Laso y col., 1997).

Además, el alcohol altera diversas funciones de los neutrófilos como la migración, quimiotaxis, y adherencia (Adams y col., 1984; Watson y col., 1994; Jareo y col., 1995). También se ha detectado que en ratas alcoholizadas aumenta la expresión de CD18 en los neutrófilos de sangre periférica y aumenta la liberación de sustancias

quimiotácticas por parte de las células de Kupffer del hígado, lo que facilita la infiltración del tejido hepático por los neutrófilos en los casos de hepatitis alcohólica aguda (Bautista y col., 1995; Cook y col., 1998).

En cuanto a los monocitos, se ha demostrado que la exposición de monocitos humanos en ensayos *in vitro* al etanol induce cambios en la producción de TNF- α , TGF- β , interleukina-6, interleukina-12, interleukina-1 α e interleukina-1 β , y disminución en la capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T (Watson y col., 1994; Cook y col., 1998; Szabo y col., 1998; Girouard y col., 1998). Los macrófagos alveolares de alcohólicos tienen reducida su capacidad para producir interleukinas proinflamatorias, iones superóxido y además tienen deteriorada su función bactericida. Todo ello sugiere que el alcohol deprime las funciones del monocito y puede contribuir a una peor respuesta frente a bacterias y virus, lo que produciría mayor susceptibilidad a algunas infecciones (Watson y col., 1994; Cook y col., 1998).

Además, se ha demostrado que el alcohol disminuye la capacidad de los monocitos para presentar antígenos a los linfocitos T. Este efecto es debido a una alteración en los primeros estadios de la presentación de antígenos, bien por un cambio funcional de los monocitos o bien por una alteración en la interacción linfocito/monocito, de manera que se reduce la inmunidad celular retardada en alcohólicos crónicos. La disminución de la capacidad de los monocitos para presentar antígenos a los linfocitos T se produce de manera indirecta debido a la disminución de IL-1 β e incremento de TGF- β que produce el etanol (Cook y col., 1998; Szabo y col., 1998; Jerrells y Sibley, 1995).

El alcohol también modifica el equilibrio de la respuesta inmunitaria TH1/TH2. Si el balance de la respuesta TH1/TH2 se desvía excesivamente en una dirección, se puede desarrollar una enfermedad inmunológica. La autoinmunidad se asocia a exceso

de respuesta TH1, mientras que la inmunodeficiencia y las alergias a TH2 (Cook y col., 1998).

Algunos estudios han observado que la exposición aguda al etanol induce una respuesta de tipo TH2 con incremento de citoquinas IL-4 e IL-10, junto con disminución de la respuesta tipo TH1 al observarse disminución de IL-12 e IFN- γ (Girouard y col., 1998; Waltenbaugh y col., 1998; Friedman y col., 1998).

18. MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES QUE MEDIAN EL DESARROLLO DE FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR ALCOHOL

Los mecanismos responsables de la progresión de la fibrosis hepática han sido estudiados en las últimas décadas, pero todavía no se comprenden completamente (Friedman y col., 2007; Iredale y col., 2007; Bataller y col., 2005). Los mecanismos celulares y moleculares son complejos.

18.1. Mecanismos de esteatosis hepática inducida por alcohol

El alcohol induce el desarrollo de hígado graso. Se ha visto como el alcohol es capaz de potenciar la lipogénesis hepática y decrecer o minimizar el descenso lipídico mediante mecanismos aún no totalmente conocidos.

Se ha observado como la esteatosis es inducida en ratones con baja grasa, basándose en una dieta a base de etanol líquido (Jeong y col., 2008b). En estos ratones se ha descrito un incremento en las células estrelladas hepáticas de unos receptores, los cannabinoides de tipo 1 (CB1), y una sobreproducción de 2-araquidonoilglicerol (2AG) en las células estrelladas. Todo ello produce una cascada de activación intracelular que favorece el desarrollo de lipogénesis, como se muestra en la figura 27.

Por otro lado se produce una inhibición de las enzimas encargadas de iniciar los procesos de β -oxidación.

Por lo tanto, una activación paracrina de los receptores hepáticos CB1 mediados por 2AG producido por la célula estrellada (sobreinducción mediada por etanol) incrementa la lipogénesis y disminuye la β -oxidación en el hepatocito.

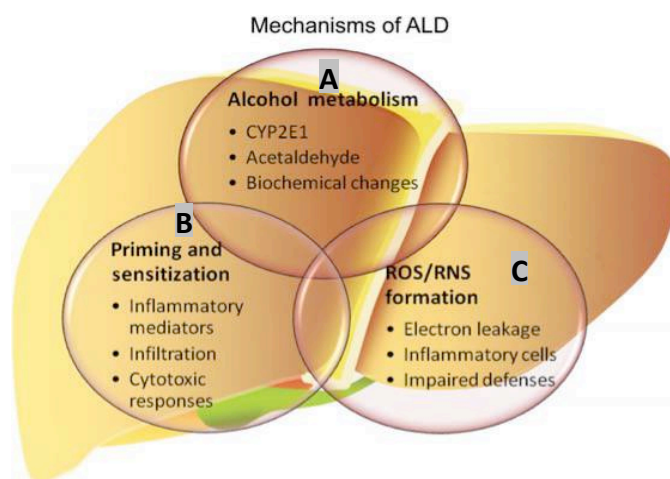


Figura 27. La hepatopatía alcohólica es una enfermedad crónica del hígado que abarca desde hígado graso (esteatosis) hasta inflamación (hepatitis) y fibrosis/cirrosis. Los efectos del alcohol que inician y hacen progresar la enfermedad incluyen el metabolismo del alcohol (A), inducción y sensibilización de la respuesta inflamatoria (B), y estrés oxidativo (C) (Figura extraída de Beier y McClain, 2010).

Además de estos factores se ha observado que los productos metabólicos producidos en la detoxificación alcohólica como el acetaldehído y el aumento de la relación NADH/NAD^+ entre otros, también alteran la β -oxidación mitocondrial hepática (Figura 28).

También aumenta los suministros de lípidos al hígado desde el intestino delgado (Baraona y col., 1979). Todo esto conduce al desarrollo de esteatosis, a través de los mecanismos expuestos en la figura 28.

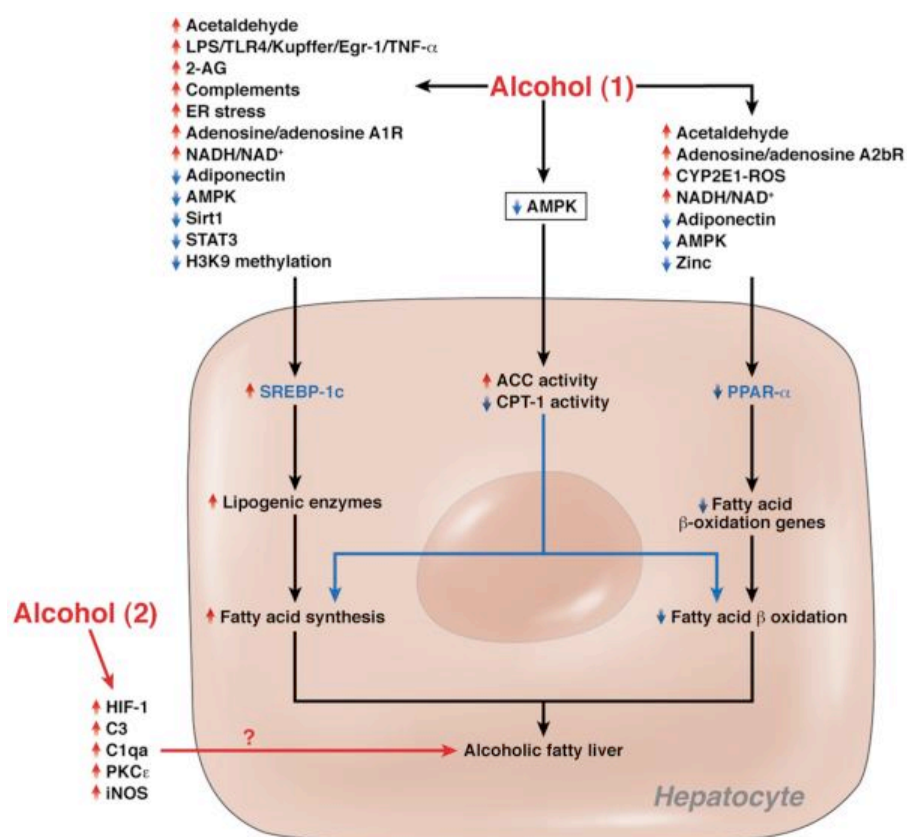


Figura 28. Acción del alcohol sobre el hepatocito en la generación de esteatosis hepática e inflamación (Figura extraída de Gao y col., 2011)

El consumo de alcohol puede estimular la expresión de Esterol regulador de unión a la proteína 1c (SREBP-1c; del inglés, *Sterol regulatory element-binding protein 1c*) e inhibir la expresión del Receptor activador de peroxisoma proliferativo (PPAR-α; del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor*), de manera directa o indirecta. Esto aumenta la síntesis de ácidos grasos e inhibe su β-oxidation en el hígado. El etanol también inhibe el AMPK y consecuentemente aumenta la actividad de acetil CoA (ACC), pero disminuye la del carnitina palmitoiltransferasa (CPT-1), y esto producirá

también un aumento de la síntesis de ácidos grasos y disminución de su β -oxidation. El etanol también puede aumentar muchos factores, incluyendo proteínas del complemento, factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), C3, C1qa, protein quinasa C (PKC) y óxido nítrico sintetasa (iNOS), que también contribuyen al desarrollo de esteatosis (Gao y col., 2011).

La apoptosis del hepatocito por alcohol está mediada por múltiples mecanismos. Estos mecanismos incluyen: hepatotoxicidad mediada por alcohol, inducción del estrés oxidativo, inhibición de los genes de supervivencia (*c-Met*), e inducción de moléculas de señalización proapoptótica (TNF- α y Fas ligando) (Tatsukawa y col., 2009; Feldstein y col., 2005).

18.2. Efectos del alcohol sobre el sistema inmunitario

La asociación de consumo excesivo de alcohol con esteatosis hepática y con necrosis de los hepatocitos es un fenómeno bien conocido. Recientemente se ha observado que el alcoholismo se acompaña también de otra forma de muerte celular: la apoptosis (Neuman y col., 2002; Tilg y col., 2000). En el desarrollo de estas lesiones están implicadas una serie de citoquinas, en particular el TNF- α , sobretodo en los estadios más iniciales de la enfermedad hepática.

La ingesta crónica de alcohol activa la respuesta inflamatoria hepática, los monocitos de sangre periférica y ciertas subpoblaciones citotóxicas linfoides T y NK (Hanck y col., 2001; Tilg y col., 2000; Laso y col., 1997). Además, se ha observado que las personas con un consumo de alcohol importante presentan concentraciones séricas elevadas de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) y de la quimioquina IL-8, así como un incremento de su síntesis en los monocitos de sangre periférica (Khoruts y col., 1991; Hill y col., 1992; Hill y col., 1993; McClain y col., 1989; 1993). Como se ha

comentado previamente, el TNF- α también es una de las citoquinas más importantes implicadas en los mecanismos relacionados con el daño hepático por alcohol, puesto que se ha observado una secreción significativa de TNF- α por las células de Kupffer (McClain y col., 1999), acompañada de un aumento de ARN mensajero de TNF y NF κ B en monocitos de sangre periférica en pacientes con cirrosis hepática (Hill y col., 2000).

Igualmente se ha observado que el consumo de alcohol causa alteración de la flora intestinal y sobrecrecimiento bacteriano (Yan y col., 2011), aumentando la permeabilidad a nivel de la mucosa intestinal y la traslocación de endotoxinas bacterianas (LPS de la pared celular de bacterias gramnegativas) desde la circulación sistémica a la circulación portal (Rao y col., 2009).

Un estímulo fundamental de la secreción de TNF- α son estos LPS que interactúan con el receptor TLR4 (que utiliza CD14 como correceptor) presente en las células de Kupffer, como se muestra en la figura 29 y 30. A través del receptor TLR4 se canalizan señales intracelulares que inducen la activación del factor de transcripción NF κ B, que regula la síntesis de TNF- α , entre otras sustancias. El NF κ B es un factor de transcripción de genes diana que codifican, además del propio TNF- α y otras citoquinas proinflamatorias, ciertos inhibidores de apoptosis, como las proteínas IAP y Bcl-XL (efector citoprotector) (Tilg y col., 2000; Hoek y col., 2002; McClain y col., 1989).

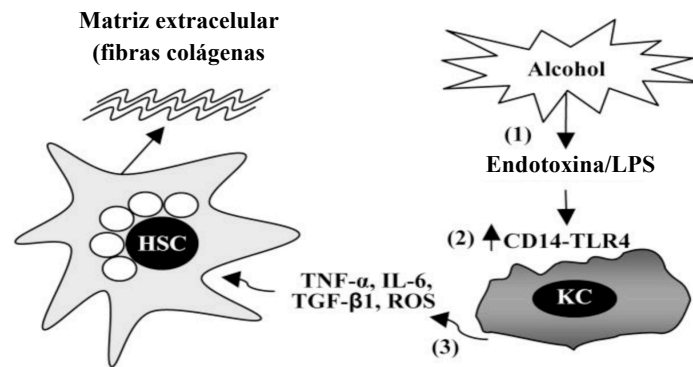


Figura 29. El alcohol aumenta el efecto pro-fibrótico de las células NK. El consumo de alcohol aumenta la permeabilidad intestinal a los LPS, por lo que aumentan las endotoxinas que activan a las células de Kupffer. Las células de Kupffer activadas producen citoquinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios como el TNF- α , IL-6, TGF- β 1, y ROS, que activarán posteriormente a las células estrelladas, que producirán a su vez las fibras de colágeno de la matriz extracelular y producirán fibrosis hepática (Figura extraída de Jeong y Gao, 2008a).

La interacción del LPS con el receptor TLR4, además de producir TNF- α , IL-6 y TGF- β 1, también produce estrés oxidativo y otros mediadores proinflamatorios que causan daño hepatocelular (Petrasek y col., 2011; Zhao y col., 2008; McMullen y col., 2005; Parlesak y col., 2000). Por otro lado, los LPS también puede activar a las células estrelladas hepáticas (CEHs) al estimular la producción de TGF- β , por lo que el alcohol amplifica el efecto profibrótico de las células de Kupffer, como se muestra en la figura 29. A su vez, las células de Kupffer producirán varios factores que también activarán a las CEH. (Cubero y col., 2009; Guo y col., 2009).

También se ha observado como el consumo crónico de alcohol incrementa la sensibilidad de las células de Kupffer a LPS por un aumento de la expresión de CD14. El etanol también activa a algunos factores del complemento, C3 y C5, y como consecuencia activa a las células de Kupffer (y estas producen TNF- α) induciendo el daño hepático (Pritchard y col., 2007), como puede observarse en la figura 30. Todos estos mecanismos descritos determinarán finalmente el desarrollo de necrosis y

apoptosis de los hepatocitos.

En resumen, el etanol activa la inmunidad innata y produce infiltración de neutrófilos y macrófagos a través de la inducción de citoquinas proinflamatorias (Figura 30). El consumo regular de alcohol también activa a las células de Kupffer, a las células estrelladas y a los hepatocitos. Su consumo también aumenta la producción de IL-8 por los hepatocitos. Además, se produce infiltración de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en el hígado. El etanol también produce formación de ROS que favorecerá la formación de aductos pueden actuar como antígenos.

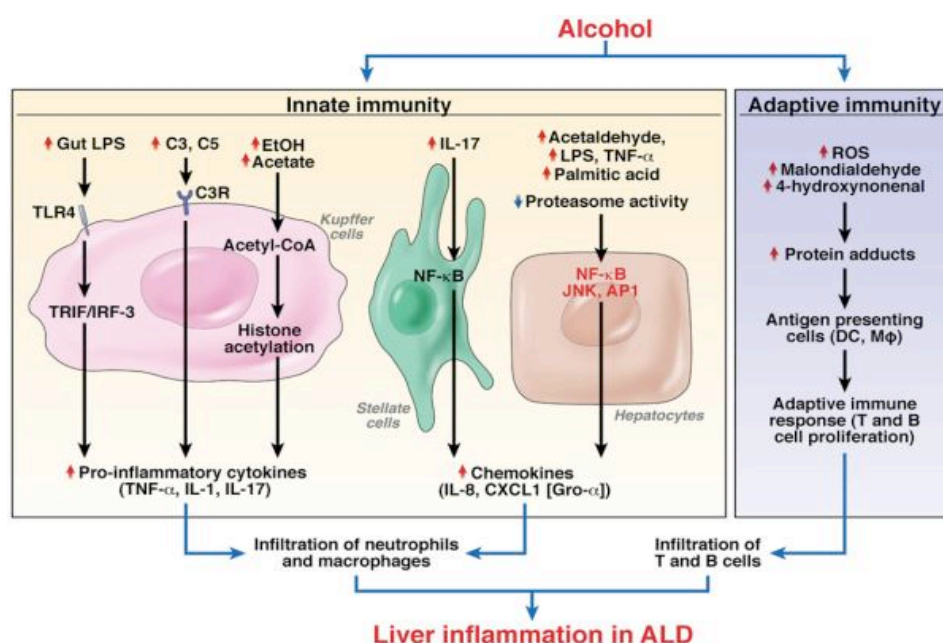


Figura 30. Mecanismos inflamatorios de la hepatopatía alcohólica que activan la inmunidad innata y adaptativa. (Figura tomada de Gao y col., 2011).

En cuanto a la inmunidad adaptativa, en individuos alcohólicos crónicos la ingesta activa de etanol también está relacionada con la secreción de citoquinas secretadas con linfocitos T, predominantemente con un patrón de secreción de tipo Th1 (Laso y col., 1999). Las citoquinas de patrón Th1 intervendrían, junto con la IL-12, en la activación y la proliferación de determinadas poblaciones linfoides T. La ingesta activa de etanol se asocia con una expansión de linfocitos T, en particular CD8⁺

(citotóxicos), que expresan en su membrana moléculas de activación (Laso 1996a; 1996b; 1997).

El etanol activa a la población linfoide T, de manera directa o bien de manera indirecta. La forma directa es promoviendo la expresión en la membrana celular de moléculas del sistema HLA (Parent y col., 1987; Singer y col., 1989). Indirectamente activa a los linfocitos T gracias a la acción inmunógena de la endotoxina (LPS) y de los neoantígenos como los aductos de acetaldehído (Niemelä y col., 1991), que se expresan, junto con moléculas HLA de clase I, en la membrana de los hepatocitos (Chedid y col., 1999). Los clones autorreactivos de linfocitos T citotóxicos activados podrían dirigirse contra tales neoantígenos, y provocar la consiguiente muerte hepatocelular por apoptosis y citotoxicidad autoinmune.

La inflamación hepática está vinculada a la muerte celular y a la acción de citoquinas secretadas como consecuencia de la endotoxinemia y del estrés oxidativo. La fagocitosis de los hepatocitos necróticos por las células de Kupffer se sigue de una activación del NF κ B, y la consiguiente síntesis de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y otros mediadores químicos de la inflamación, como los eicosanoides.

El TNF- α es un factor determinante de disfunción endotelial, que se manifiesta, entre otros datos, por un aumento de la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión en las células del endotelio de los sinusoides hepáticos. En conjunto, las quimioquinas ejercen una acción quimiotáctica y activadora de los olinucleares neutrófilos, y favorecen el reclutamiento hacia el hígado de leucocitos circulantes.

Independientemente de la causa del daño hepático (etanol, virus hepatotropos, sobrecarga de hierro o cobre), finalmente la lesión histológica común será la fibrosis, o acumulación de proteínas de la matriz intercelular, como el colágeno de tipo I y III, los

proteoglicanos (condroitin sulfato) y las glucoproteínas. Las células con mayor trascendencia fibrogénica son las estrelladas.

18.3. Células estrelladas hepáticas

Las células estrelladas hepáticas (CEHs) son células mesenquimales, perisinusoidales ubicadas a lo largo de los sinusoides en el espacio perisinusoidal de Disse, aunque también pueden observarse entre las células parenquimatosas (Ramadori 1991; Eastman y col., 1981). Este tipo celular es denominado células de Ito, lipocitos o células perisinusoidales hepáticas.

En su estado quiescente las CEH constituyen un 5-8% del número total de células hepáticas (Senoo y col., 2004; Geerts y col., 2001). En personas sanas, estas células están quiescentes, y se encargan del almacenamiento del retinol (vitamina A) (Blomhoff y col., 1991).

Estas células también juegan un papel importante en el desarrollo de la fibrosis hepática, y se las considera actualmente el principal tipo celular fibrogénico del hígado (Bataller y col., 2005; Friedman, 2008). Cuando aparece un agente que produce una lesión hepática prolongada, se empieza a secretar una serie de diversas citoquinas y mediadores procedentes de otros tipos celulares hepáticos que estimulan la transformación fenotípica o «activación» de las células estrelladas. Estas células estrelladas activadas migran y proliferan a los focos inflamatorios, desempeñando un papel clave en la patogenia de la fibrosis hepática. Por una parte, secretan sustancias quimiotácticas que reclutan más células inflamatorias, y por otra, sintetizan colágeno que se acumula en el tejido hepático. Por tanto, el proceso de «activación» de las CEH se considera un hecho clave en la patogenia de la fibrosis hepática. Las sustancias que regulan la transformación fenotípica y la proliferación de las CEH en los focos de reparación tisular derivan en su mayoría de los hepatocitos dañados, de las células de

Kupffer activadas y del propio infiltrado inflamatorio (Figura 31). Si el agente causal de la lesión hepática es eliminado, se produce una resolución parcial de la fibrosis, mediante la degradación del colágeno por medio de las colagenasas y la desaparición de las células estrelladas hepáticas activadas mediante su apoptosis, pero si el agente lesivo persiste la lesión hepática progresará por el mantenimiento de la acción de las células estrelladas (Bataller y col., 2002).

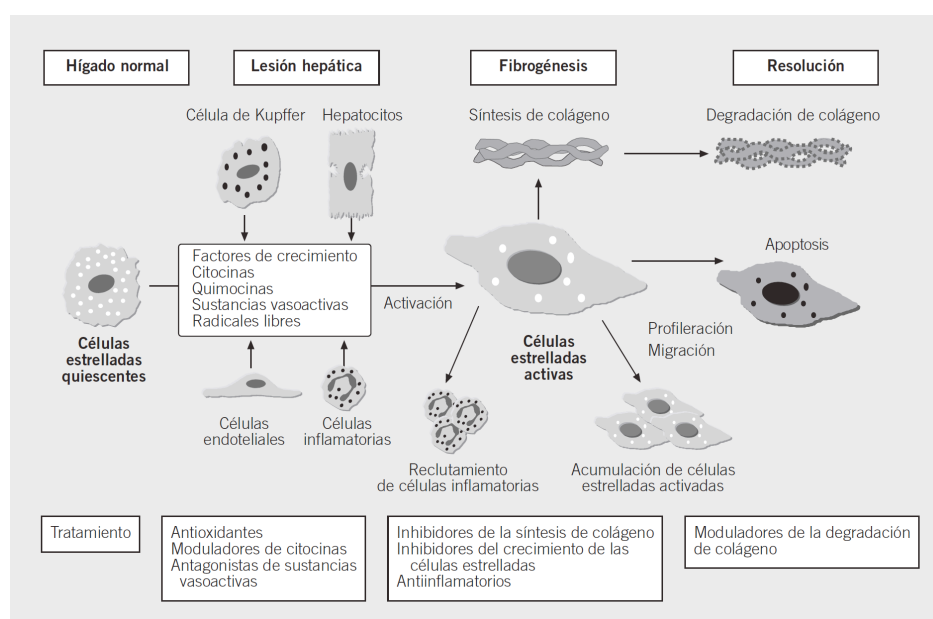


Figura 31. Esquema de las acciones biológicas que inciden en la activación de las células estrelladas hepáticas, y mecanismos de acción de los diversos tratamientos antifibrogénicos (Figura extraída de Bataller y col., 2002).

18.3.1. Función de la célula estrellada hepática en hígado sano

En condiciones normales, las CEH cumplen varias funciones en el hígado como, por ejemplo, el almacenamiento de la vitamina A, controlar la comunicación intercelular por medio de la liberación de varios mediadores intercelulares y remodelar gran parte de la poca matriz extracelular (MEC) presente en un hígado normal (Pinzani y col, 2001). Las CEH tienen como propósito básico controlar la homeostasis tisular y

mantener una especie de equilibrio fisiológico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC.

Las CEH juegan también un papel importante en la respuesta inmune a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas, y de la interacción con otras células del sistema inmunitario. También contribuyen a la angiogénesis y la regulación del estrés oxidativo (Bonachi y col., 2003).

18.3.2. Activación de la célula estrellada hepática

Cuando se produce daño hepático se ponen en marcha una serie de mecanismos de activación de la CEH, sufriendo un proceso complejo por el que pasan de un estado quiescente a un fenotipo activo con capacidad proliferativa, fibrogénica, contráctil y con escaso contenido en vitamina A, iguales a los miofibroblastos, y con capacidad de sobreproducción y acumulación de colágeno en el hígado (Friedman, 1999b, 2007).

Se han identificado múltiples citoquinas y factores de crecimiento que intervienen en la activación de las CEH favoreciendo la fibrogénesis hepática, como el factor de transformación β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que son los factores más importantes implicados en la transformación, proliferación y migración de las CEH (Friedman y col., 2007), como se observa en la figura 32. Además, estas células también pueden ser activadas por células del sistema inmunitario, hepatitis virales, toxinas como el acetaldehído (producto del metabolismo del alcohol), la esteatohepatitis alcohólica, y trastornos autoinmunes (Pinzani y col., 2010; Marra y col., 2009; Friedman, 2008; Bataller y col., 2005; Friedman, 1999b).

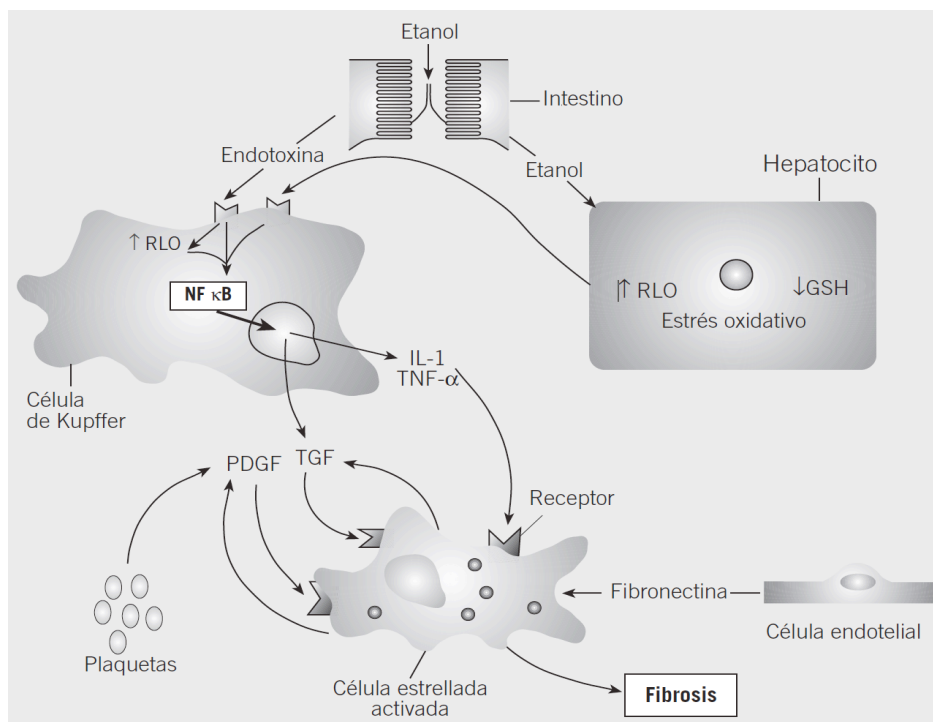


Figura 32. Mecanismos de fibrogénesis en la enfermedad hepática alcohólica. GSH: glutatión; IL: interleucina; NFκB: factor nuclear kappa B; PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; RLO: radicales libres de oxígeno; TGF: factor transformante de crecimiento; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa (Figura extraída de Laso y col., 2005).

El proceso de activación de la célula estrellada presenta dos fases, tal como se indica en la figura 33. Primero se produce la fase de *iniciación*, también llamada “estado preinflamatorio” y posteriormente la fase de *mantenimiento*, que puede estar seguida de una fase de *resolución* si el daño cesa.

En la fase de *iniciación* se producen los cambios iniciales en la expresión de genes y en su fenotipo que hacen que las células respondan a otras citoquinas. Esta estimulación es paracrina e incluye la exposición a peróxidos lipídicos, productos derivados del daño hepático, y señales provenientes de las células de Kupffer y las células endoteliales. De esta forma se produce una activación temprana de las CEH, así como cambios alrededor de la matriz extracelular. Una vez activada la CEH, el *mantenimiento* consiste en la persistencia del estímulo que produce activación del

fenotipo y genera fibrosis. La activación sostenida implica al menos siete cambios en el comportamiento celular: proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis, contractilidad, degradación de la matriz, pérdida de retinoides, y la liberación de quimioquinas y citoquinas. El efecto neto de estos cambios produce un incremento de la acumulación de matriz extracelular. Durante esta fase hay una liberación de estímulos proinflamatorios, profibrogénicos y promitogénicos que actúan de manera autocrina y paracrina. La fase de resolución incluye los mecanismos que causan la apoptosis de la CEH, ya sea senescente o quiescente (Krizhanovsky y col., 2008).

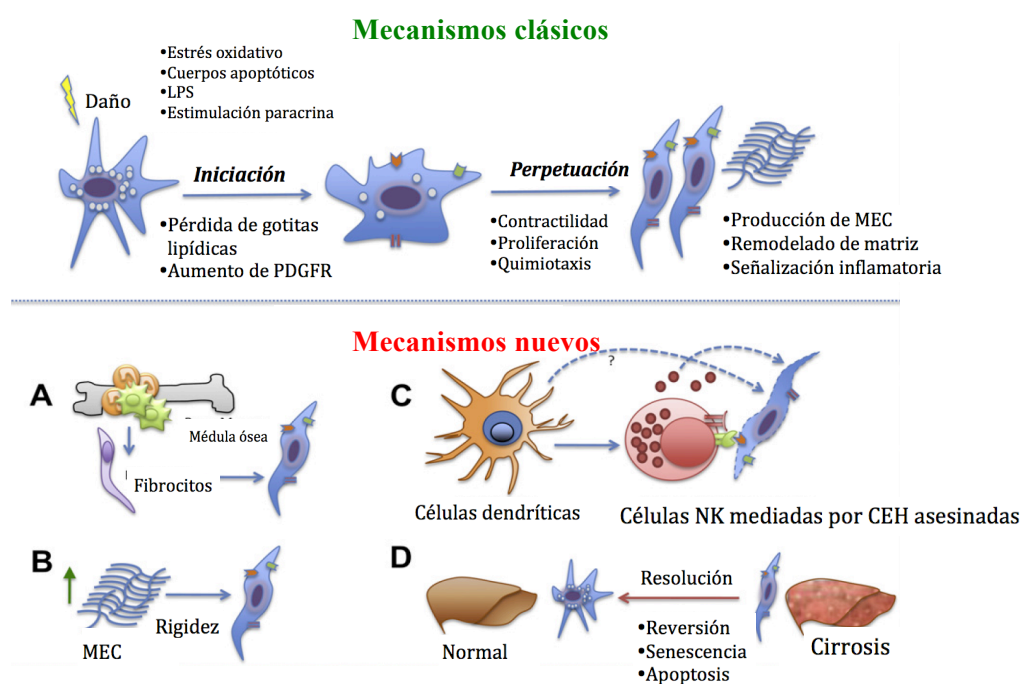


Figura 33. Activación de la célula estrellada a través de los mecanismos clásicos (cuadro superior) y a través de nuevos mecanismos (cuadro inferior).

El acetaldehído producto del metabolismo del etanol en los hepatocitos actúa sobre las CEH de manera paracrina. Lo hace a través de una serie de vías de señalización y factores de transcripción. Se une a componentes celulares formando

aductos como el malondialdehído, 4-hydroxinonenal y malondialdehído-acetaldehído, que ayudan a mantener a la CEH activada (Mello y col., 2008).

18.4. Células de Kupffer

Las células de Kupffer son células del sistema inmunitario pertenecientes al grupo de los macrófagos que se localizan en el hígado. Estas células producen citoquinas, factores de crecimiento y mediadores biológicamente activos. Además, se encargan de la eliminación de sustancias extrañas y la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Las células de Kupffer desempeñan también un papel fisiopatológico destacado en el daño hepático por endotoxina o alcohol y en la patogénesis de la inflamación y fibrosis hepática.

En condiciones fisiológicas, eliminan de la circulación sanguínea todo tipo de partículas extrañas, innecesarias o alteradas mediante el proceso de fagocitosis (Gao y col., 2008; Lovdal y col., 2000). Participan en el metabolismo de las lipoproteínas e intervienen en el proceso de captación y de detoxificación de las endotoxinas que llegan del flujo venoso portal desde el intestino (Fox y col., 1990; Shiratori y col., 1993).

Al igual que otros fagocitos mononucleares, actúan como células presentadoras de antígenos activando la respuesta inmunitaria derivada de los linfocitos T (Rogoff y col., 1981), que también pueden desencadenar una respuesta citotóxica semejante a la realizada por las células NK para eliminar células tumorales circulantes (Schuurman y col., 1995).

Además, la activación de las células de Kupffer da lugar a la secreción de potentes radicales libres derivados del oxígeno, intermediarios del nitrógeno, numerosas citoquinas y eicosanoides (Decker y col., 1990).

El mecanismo por el cual las células de Kupffer participan en la lesión alcohólica no está totalmente establecido, pero se ha observado un incremento del número de células de Kupffer en el hígado de pacientes con hepatitis alcohólica (Karakucuk y col., 1989). También se ha sugerido que puede estar relacionado con la incapacidad de estos macrófagos de eliminar las endotoxinas (Adachi y col., 1995).

Los ROS que producen las células de Kupffer también pueden dañar al hepatocito (Knecht y col., 1995). Por otro lado, la liberación de prostaglandina E2 (PGE₂) por la célula de Kupffer en respuesta al alcohol induce la síntesis de triglicéridos por los hepatocitos, cuya acumulación contribuiría a la aparición de esteatosis (Enomoto y col., 2000).

Ante la presencia de alcohol, las células de Kupffer pueden secretar IL-8, la cual es un potente agente quimiotáctico inductor de la infiltración de neutrófilos (Maher y col., 1995). Otros factores que pueden liberar las células de Kupffer activadas por el etanol son IL-1, IL-6, TGF- β 1 y TNF- α (Thornton y col., 1991; Shiratori y col., 1993).

18.5. Células *Natural Killer* en el hígado

Las células NK forman parte del sistema inmunitario, y juegan un papel muy importante en la defensa contra infecciones virales y células tumorales. El mecanismo a través del cual la célula NK mata a otra célula se basa en el balance neto entre las señales emitidas por receptores inhibidores y activadores que se expresan en su membrana (Lanier, 2005; Colucci y col. 2003; McQueen y Parham 2002). La actividad proliferativa de estas células es muy baja, y en el hígado, la población de células NK son continuamente repuestas desde una fuente extrahepática, que suele ser la médula ósea. Bajo condiciones fisiológicas normales, tienen un rápido recambio, permaneciendo entre 1-2 semanas en el hígado (Vanderkerken y col., 1993).

18.5.1. Efecto antifibrótico de las células NK

Se ha descrito que las células NK tienen una actividad antifibrótica a través de la destrucción de las CEH activadas (Gur y col. 2012; Muhanna y col. 2011). En condiciones normales las CEH se encuentran quiescentes, pero al producirse daño hepático se activan y se comportan como los miofibroblastos, produciendo colágeno e iniciando el proceso fibrótico. Esta activación da lugar a la aparición de un conjunto de células estrelladas en diferentes fases de activación y diferenciación, con diferentes fenotipos de transición, expresión de genes y funciones en base a la cantidad de retinol presente en su citoplasma y el daño en su ADN (Friedman, 2008).

Se ha descrito un tipo de CEH denominada “tempranamente activada” que aparece a los siete días tras iniciarse el daño hepático, que presenta alta acumulación de retinol en su citoplasma y cuya metabolización a ácido retinoico induce la expresión de ácido retinoico tempranamente inducible-1 (RAE-1, del inglés, *retinoic acid early inducible-1*), ligando de NKG2D en la células NK en ratones, que induce la activación de la célula NK que producirá la destrucción de la CEH tempranamente activada.

A los veintiún días aproximadamente la CEH ha agotado sus reservas de retinol y no expresa RAE-1. La ausencia de este ligando la hace resistente a la apoptosis mediada por la célula NK. Se dice en este momento que está completamente activada. Posteriormente, cuando aparecen daños en el ADN se induce la expresión de antígeno HLA clase I no clásico relacionado con cadena del gen A (MICA, del inglés, *MHC class I chain-related gene A*) en la CEH, el cual es el ligando más potente del receptor NKG2D. En este momento la CEH comienza su estado de “activada senescente”. MICA se une al ligando NKG2D en humanos induciendo la activación de la célula NK que producirá la destrucción de la CEH (Figura 34).

Por tanto, las células NK destruyen a las CEHs activadas tempranamente y a las senescentes, pero no destruye a las quiescentes ni a las completamente activadas (Radaeva y col., 2007; Krizhanovsky y col., 2008). La inducción de la apoptosis de las CEH a través de las células NK disminuye por tanto la producción de colágeno y de fibrosis.

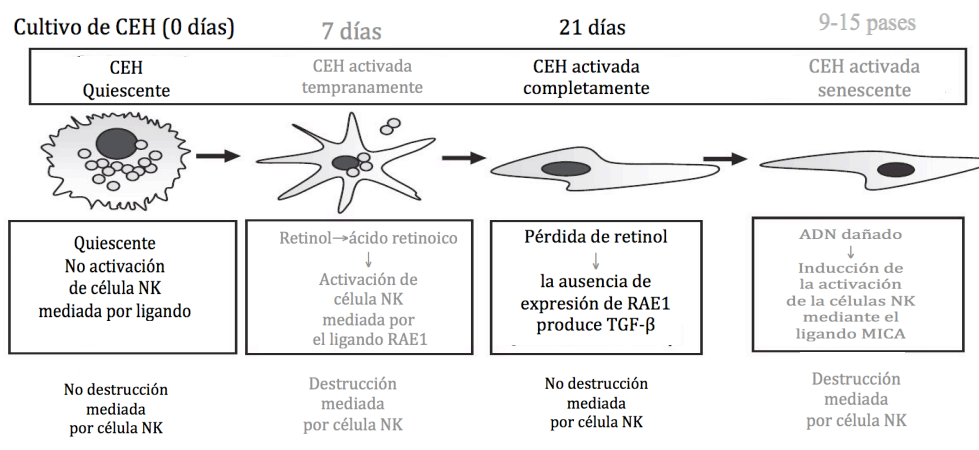


Figura 34. CEH en sus diferentes estados de transición. Las células activadas tempranamente y las senescentes son las susceptibles de apoptosis mediada por la célula NK (Figura extraída de Gao y col., 2009).

La regulación de la fibrosis está mediada a través de un proceso de equilibrio entre los mecanismos pro-fibróticos y anti-fibróticos. Las células pro-fibróticas como los macrófagos M1, los neutrófilos, los linfocitos Th17, linfocitos T CD8+, y células NK, pueden secretar citoquinas pro-inflamatorias y otros mediadores, que activan a la CEH y produce colágeno. Por otro lado, las células anti-fibróticas incluyen macrófagos M2, células de la médula ósea CD11b+Gr1+, linfocitos Th17, células NK, y células NKT, las cuales inhiben la activación de las CEH mediante la producción de IL-10, IFN-γ, TRAIL, o IL-22.

Algunas células también pueden jugar un papel dual en la patogénesis de la fibrosis hepática a través de una vía diferente a la de regulación de la activación de las CEH, como los macrófagos, las células dendríticas, NKT, y células Th17 (Hyon-Seung y col., 2013), como se muestra en la figura 35.

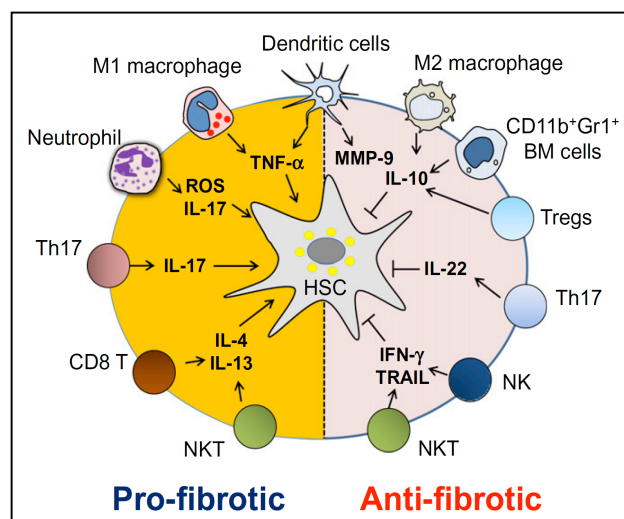


Figura 35. Interacción entre CEH y otras células de sistema inmune que intervienen en la regulación de la fibrosis (Hyon-Seung y col., 2013).

18.5.2. Efectos del alcohol sobre el número y actividad de las células

NK

El consumo crónico del alcohol suprime la función de las células NK debido a la inhibición de su expresión de TRAIL, NKG2D e IFN- γ (Jeong y col. 2008a). Esta inhibición contribuye a la progresión de la fibrosis hepática.

Además, el alcohol reduce el porcentaje y número de células NK (Perney y col., 2003) a través de la inhibición de la liberación de las células NK desde la médula ósea, y esto se asocia a una disminución de las células NK esplénicas (Zhang y Meadows 2008). También aumenta la apoptosis de las células NK en el bazo y médula ósea. Este

efecto parece estar relacionado con la disminución de IL-15 que produce (Pruett y col., 2003), por un mecanismo que se resume en la figura 36.

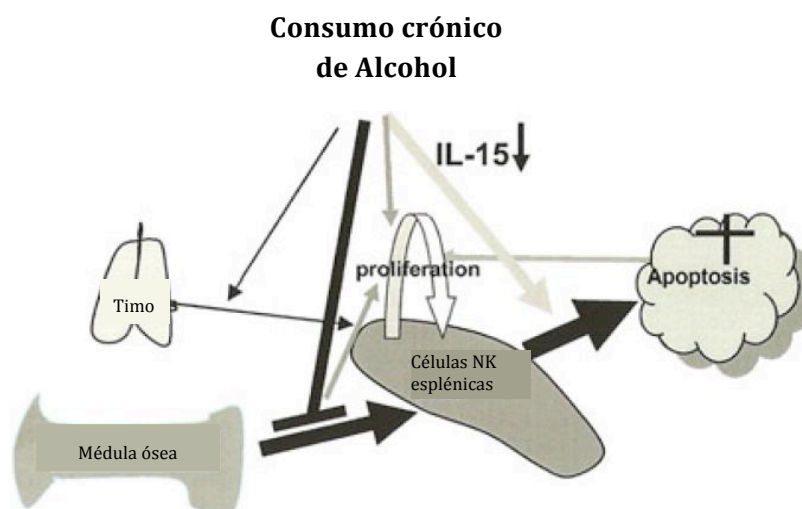


Figura 36. Efectos del consumo crónico de alcohol sobre la célula NK en la médula ósea y en el bazo (Figura extraída de Zhang y Meadows 2011).

Por otro lado, el alcohol induce la producción de altos niveles de TGF- β por parte de las CEHs completamente activadas y por los miofibroblastos, siendo uno de los más potentes inhibidores de la activación de la célula NK. De esta manera evita la apoptosis de la CEH (Jeong y col., 2011).

18.6. Mecanismos de lisis de célula estrellada hepática por células NK

Las células NK se activan a través de ligandos TLR (TLR3, TLR4), que interaccionan con los receptores NKG2D, NKp46, TRAIL (Figura 37 y 38). Estos receptores están implicados en el control de la fibrosis hepática a través de la destrucción de las CEHs. Las CEH activadas tempranamente y senescentes expresan altos niveles de ligandos de células NK que se unen a los receptores activadores NK

(citados previamente), induciendo la activación de la célula NK que producirá la apoptosis a través de mediadores citotóxicos selectivos. La célula NK activada también producirá IFN- γ , destruyendo a la CEH directamente y aumentando la citotoxicidad (Glässner y col., 2012; Gur y col., 2012; Gao y col., 2103).

La célula NK sólo destruye a la CEH activada tempranamente o a la senescente (no a la quiescente ni a la completamente activada). El motivo por el que la CEH quiescente o completamente activada no es destruida por la célula NK es porque la CEH no expresa en su membrana elevados niveles de ligandos activadores de las células NK, y por tanto la célula NK no puede reconocer a ese tipo de CEH por lo que se produce un aumento de la resistencia a la apoptosis (Radaeva y col., 2007; 2006; Glassner y col., 2012).

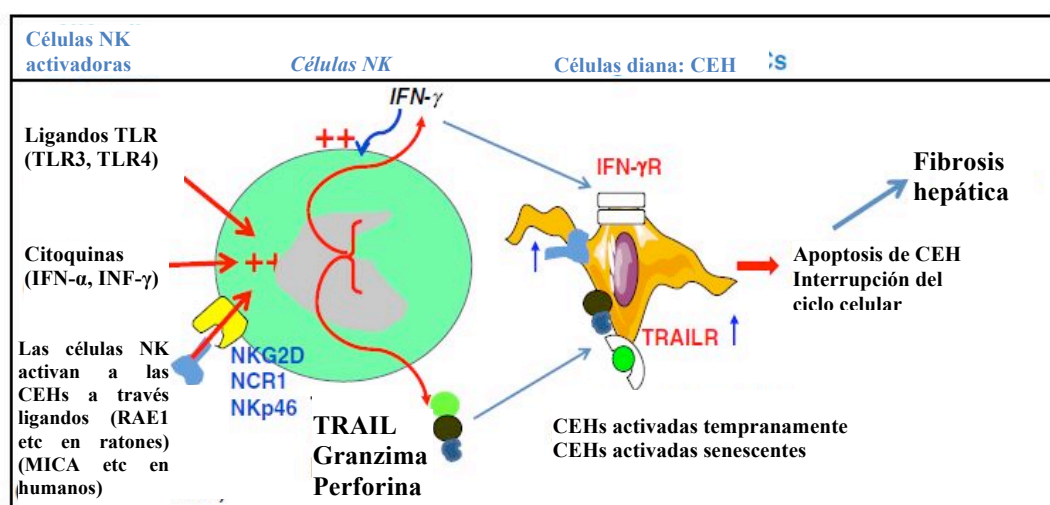


Figura 37. Mecanismos del efecto antifibrótico de la célula NK (Figura extraída de Gao y col., 2103).

Los receptores KIR también tienen un papel importante en el efecto antifibrótico. Los receptores KIR inhibidores (iKIR) presentes en la célula NK se unen a sus ligandos, moléculas de HLA clase I (MHC-1) presentes en la CEH, inhibiendo su destrucción (Figura 38). Cuando se produce daño hepático disminuye la expresión de

los receptores KIR inhibidores, y por tanto, disminuye el efecto inhibitor sobre la destrucción de las CEHs. La unión de iKIR con MHC-1 pone en marcha una serie de mecanismos que favorecerán la apoptosis de la células estrellada. Otra señal que induciría la apoptosis es STAT1, como se muestra en la figura 38 (Muhanna y col. 2011; Jeong y col., 2008c).

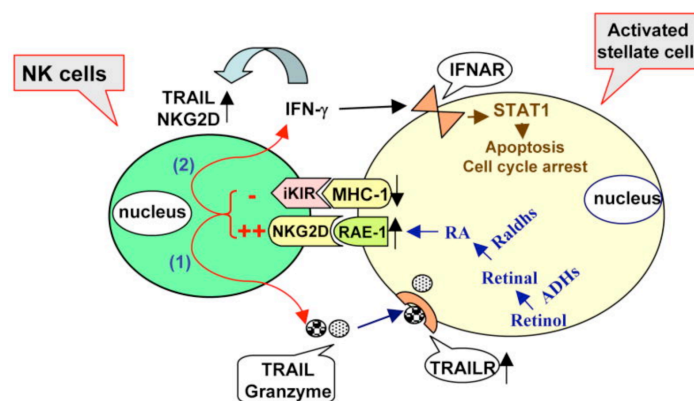


Figura 38. Mecanismos de citotoxicidad mediada por la célula NK contra la CEH (Figura extraída de Jeong y col., 2008c).

MHC-1: complejo mayor de histocompatibilidad; RAE1: ácido retinoico tempranamente inducible-1, RA: ácido retinoico.

Las células NK también pueden ser activadas por varios ligandos TLR, pero también a través de la producción de citoquinas como el IFN- γ . El IFN- γ no sólo induce directamente la muerte de la CEH, si no que aumenta todavía más la citotoxicidad contra la CEH deteniendo el ciclo celular (Jeong y col., 2006; Rockey y col., 1992).

El alcohol inhibe el efecto anti-fibrótico de las células NK a través de múltiples mecanismos que incluyen la disminución del número de células NK y de la citotoxicidad de las células NK contra las CEH; el aumento de la producción de TGF- β 1 por parte de la CEH, seguido de la inhibición de su apoptosis mediada por las células NK. Además, el alcohol induce la expresión del supresor de la señalización de

citoquina 1 (SOCS1; del inglés, *suppressor of cytokine signaling 1*) sobre CEH, seguido de la inhibición de la producción de IFN- γ por parte de la CEH. El etanol también estimula a los hepatocitos a producir moléculas de estrés oxidativo lo cual inhibe la producción del IFN- γ por parte de la CEH (Jeong y col., 2008a).

Se ha identificado la señal de transducción y activación de la transcripción 1 (STAT1) como un importante regulador negativo de la fibrosis hepática. La activación de STAT1 atenúa la fibrosis hepática a través de la inhibición de la proliferación de la célula estrellada, la atenuación de la señalización de TGF- β , y la estimulación de las células NK que, a su vez, inhiben a la célula estrellada.

19. GENES KIR

Los receptores de células NK pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas (KIR, del inglés, *Killer cell immunoglobulin-like receptors*) son un grupo receptores de membrana que se expresan en la superficie de las células NK y en subpoblaciones de linfocitos T γ y δ (Falk y col., 1995; Mingari y col., 1997). Los receptores KIR fueron identificados serológicamente por primera vez por Moretta y col., 1993.

Los genes KIR, son una familia de genes polimórficos altamente homólogos ubicados en el cromosoma 19q13.4 dentro del denominado complejo del receptor leucocitario (LRC, del inglés, *Leukocyte Receptor Complex*) tal como se muestra en la figura 39. Se han identificados 16 genes KIR (Dupont y col. 1997; Wende y col. 1999). El LRC también codifica otras familias de receptores tales como la familia LILR (del inglés *Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor*), la familia LAIR (del inglés *Leukocyte-Associated Inhibitory Receptor*) y el receptor de Fc α .

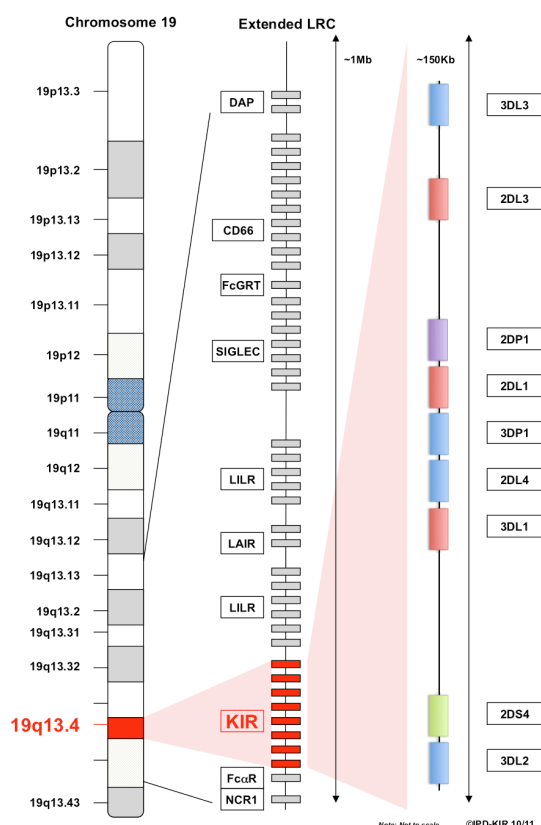


Figura 39. LCR (cromosoma 19q13.4) junto con un haplotipo KIR. El LCR codifica además de los genes KIR, proteínas adaptadoras DAP, antígeno CD66, así como receptores SIGLEC, FcγRT, LILR, LAIR, FcαR y NCR1.

Los estudios realizados en los últimos años han puesto de manifiesto una amplia diversidad KIR, que deriva tanto de su polimorfismo genético como alélico (Uhrberg y col., 1997; Selvakumar y col., 1997). Como consecuencia de ello, sólo hay una pequeña probabilidad de que dos individuos seleccionados aleatoriamente tengan el mismo genotipo KIR (Shilling y col., 2002a).

El descubrimiento de esta familia de receptores KIR ha sumado una función adicional a las moléculas de clase I del antígeno leucocitario humano (HLA-I). Las moléculas de HLA-I, a través de su interacción con los receptores KIR modulan la

actividad de las células NK y de un grupo de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Vilches y Parham, 2002).

19.1. Nomenclatura y estructura de los receptores KIR

La Organización sobre el Genoma Humano (HUGO) ha establecido una nomenclatura para estandarizar la estructura y función de los genes KIR, en base a un código de letras y números, según el número de dominios Ig extracelulares y las características de su cola intracitoplasmática, tal como se muestra en la figura 40 y 41, ya que clásicamente los genes KIR han tenido numerosas nomenclaturas (Tabla 16).

Tabla 16. Nomenclatura de los genes KIR.

Gene Symbol	Protein Symbol	Description	Alíases
<i>KIR2DL1</i>	KIR2DL1	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 1	47.11, CD158a, cl-42, nkat1, p58.1
<i>KIR2DL2</i>	KIR2DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 2	CD158b1, cl-43, nkat6
<i>KIR2DL3</i>	KIR2DL3	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 3	CD158b2, cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58
<i>KIR2DL4</i>	KIR2DL4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4	15.212, 103AS, CD158d
<i>KIR2DL5A</i>	KIR2DL5A	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 5A	CD158f, KIR2DL5.1
<i>KIR2DL5B</i>	KIR2DL5B	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4
<i>KIR2DS1</i>	KIR2DS1	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 1	CD158h, EB6ActI, EB6ActII
<i>KIR2DS2</i>	KIR2DS2	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 2	183ActI, CD158j, cl-49, nkat5
<i>KIR2DS3</i>	KIR2DS3	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 3	nkat7
<i>KIR2DS4</i>	KIR2DS4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4	CD158i, cl-39, KKA3, nkat8
<i>KIR2DS5</i>	KIR2DS5	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 5	CD158g, nkat9
<i>KIR2DP1</i>	KIR2DP1	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, pseudogene 1	KIR2DL6, KIR15, KIRY, KIRZ
<i>KIR3DL1</i>	KIR3DL1	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1	AMB11, CD158e1, cl-2, cl-11, KIR, nkat3, NKB1, NKB1B
<i>KIR3DL2</i>	KIR3DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2	CD158k, cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b
<i>KIR3DL3</i>	KIR3DL3	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3	CD158z, KIR3DL7, KIR44, KIRC1
<i>KIR3DS1</i>	KIR3DS1	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, short cytoplasmic tail, 1	CD158e2, nkat10
<i>KIR3DP1</i>	KIR3DP1	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, pseudogene, 1	CD158c, KIR2DS6, KIR3DS2P, KIR48, KIRX

Long y col., 1996; Marsh y col., 2003; Vilches y col., 2002; Gómez-Lozano y col., 2002.

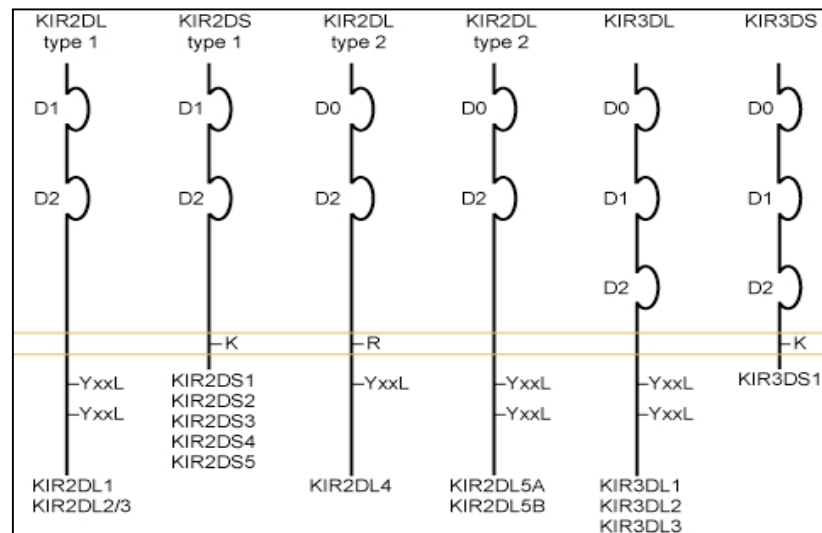


Figura 40. Dominios estructurales de las moléculas KIR. La letra K es un residuo de lisina (Lys) transmembrana y la letra R es un residuo de Arginina (Arg).

Los dominios de Ig extracelulares se denominan desde la posición más distal de la membrana como D0, D1 y D2. Si los receptores KIR presentan sólo dos de los tres dominios se nombran como 2D (KIR2D), y si presentan los tres dominios se nombran como 3D (KIR3D).

Los receptores KIR2D pueden tener los dominios D1-D2 (tipo I) o los dominios D0-D2 (tipo II), siendo el tipo I de receptores KIR2D el más frecuente, mientras que al tipo II solo corresponden el KIR2DL4 y el KIR2DL5 (Vilches y col., 2000a; 2000b).

Dependiendo de los dominios intracelulares se distinguen otros dos tipos: KIR inhibidores (iKIR) que poseen un tallo citoplasmático largo (L, del inglés *Long tail*) y la presencia de uno o dos motivos ITIM (del inglés *Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motifs*), que son los responsables de su función inhibidora, y KIR activadores (aKIR) caracterizados por un tallo citoplasmático corto (S, del inglés *Short tail*), que carecen de ITIMs, pero poseen un residuo de lisina (Lys) cargado en la región transmembrana que permite la asociación del receptor KIR con la molécula accesoria

DAP12, que produce una señal activadora a través de motivos ITAM (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif*) (Trowsdale y col. 2001; Moretta A., 1997).

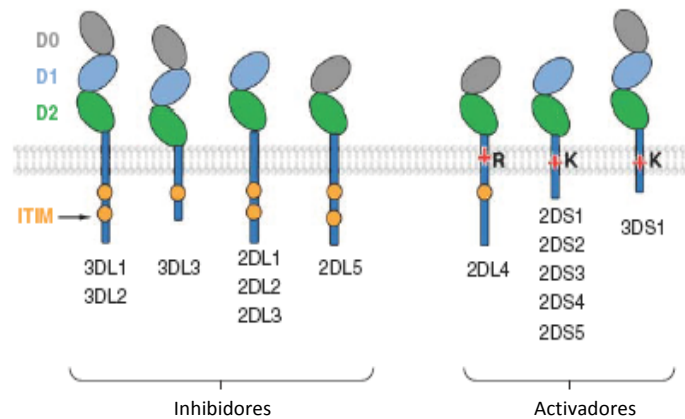


Figura 41. Dominios estructurales intracelulares y extracelulares de los receptores KIR clasificados según su actividad activadora (derecha) o inhibidora (izquierda). Se observan los diferentes dominios intra y extracelulares de cada uno de los genes KIR, así como los cambios en los aminoácidos transmembrana. R: arginina; K: lisina (Figura extraída de Bashirova y col., 2006)

Existe un receptor (KIR2DL4) que a pesar de poseer un brazo citoplasmático largo con un motivo ITIM, presenta en su región transmembrana el aminoácido arginina (Arg) cargado, por lo que tiene función activadora e inhibidora (Rajagopalan y cols., 2001).

Además también se han identificado dos pseudogenes KIR, a los que actualmente se les ha asignado la letra P (KIR2DP1 y KIR3DP1), cuyos transcritos de ARN-m y proteína no han sido identificada todavía, y no codifican ninguna molécula KIR funcional (Uhrberg y col. 1997).

Se han identificado ocho genes que codifican para iKIR (KIR3DL1-3, KIR2DL1-4 y KIR2DL5), y seis genes para aKIR (KIR3DS1 y KIR2DS1-5).

Sólo hay un gen que codifica el receptor KIR2DL4 con función tanto inhibidora como activadora (Faure y col., 2002; Rajagopalan y col. 1999).

Los genes KIR se caracterizan por su alto polimorfismo génico y alta diversidad alélica. Continuamente se están identificando nuevas formas alélicas que pueden o no codificar diferentes transcritos y formas proteicas (IPD-Database). La figura 42 muestra el número de alelos y proteínas encontradas para cada gen KIR.

Allele Information								
KIR Alleles:					678			
KIR Alleles								
Gene	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3
Alleles	44	29	44	51	43	15	22	15
Proteins	24	12	23	27	18	7	8	6
Nulls	2	0	1	0	0	0	0	1
Gene	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
Alleles	30	18	92	16	86	108	28	27
Proteins	13	12	62	13	62	56	0	0
Nulls	0	0	1	1	1	0	0	0
Component Information								
Number of Component Entries:								941
Number of Source Cells:								1,002

Figura 42. Datos actuales sobre el número de alelos y proteínas encontradas para cada gen KIR (www.allelefrequencies.net).

19.2. Tipos de Haplotipos KIR

El contenido genético de un individuo permite inferir 2 tipos de haplotipos KIR, el denominado haplotipo A y haplotipo B, mostrados en la figura 43 (Parham y col., 2003; Wilson y col., 2000a; Wende y col., 2000; Wende y col., 1999).

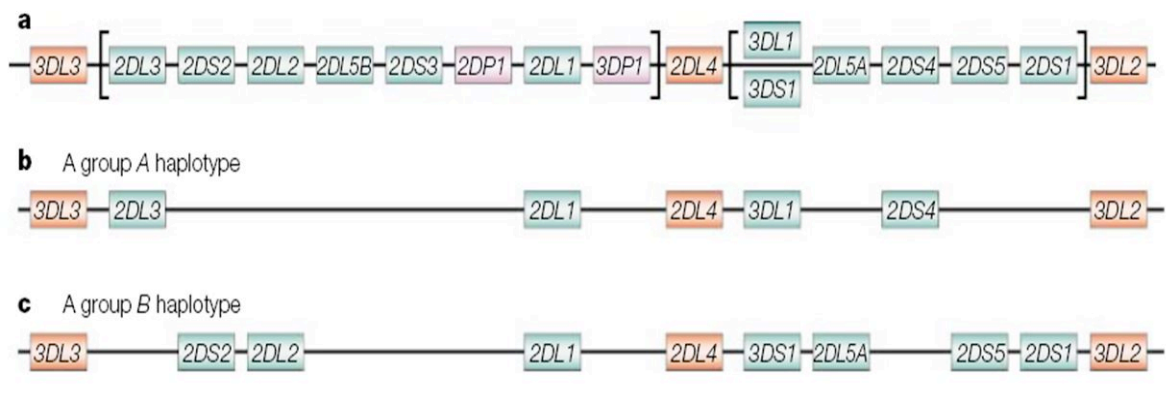


Figura 43. Disposición de los genes KIR a lo largo del cromosoma, mostrando los 2 tipos principales de haplotipos A y B. Se muestra la estructura de los dos haplotipos KIR según el orden de sus genes. Los genes de color rojo son los genes constitutivos y se encuentran en la parte central y en los extremos (3DL3, 3DL2, 2DL4 y 3DP1). Los de color rosa son los pseudogenes (2DP1 y 3DP1), y los verdes son el resto de genes no constitutivos (Figura tomada de Parham y col., 2003).

El haplotipo A contiene siete genes y dos pseudogenes, y se caracteriza por codificar genes de receptores principalmente inhibidores (KIR3DL3, KIR2DL3, KIR2DP1, KIR2DL1, KIR3DP1, KIR2DL4, KIR3DL1 y KIR3DL2), y sólo un gen activador (KIR2DS4). En cambio, el haplotipo B presenta mayor variabilidad genética y contiene varios genes que codifican receptores activadores (Figura 44).

La población humana presenta ambos grupos (haplotipo A y B) pero sus frecuencias pueden variar considerablemente de unos individuos a otros (www.allelefrequencies.net; Parham y col., 2005a; Yawata y col., 2002; Norman y col., 2001).

Las frecuencias de los haplotipos KIR varía en la población entre los diferentes grupos étnicos (Norman y col., 2001; Crum y col., 2000; Witt y col., 1999). Estas diferencias de haplotipos KIR entre poblaciones pueden ser determinantes en la susceptibilidad o prevención de un grupo a la hora de desarrollar una determinada enfermedad.

19.3. Genotipos KIR generales

Según el tipo de haplotipos heredados en un individuo, se pueden establecer tres genotipos diferentes (AA, BB, AB). Los individuos que sean portadores solamente del haplotipo A son considerados homocigotos para el haplotipo A y se denomina genotipo AA. Aquellos individuos que no poseen ni KIR2DL1, 2DL3, 3DL1 o 2DS4, llevan dos copias del haplotipo B y se denomina genotipo BB. El resto de individuos son considerados heterocigotos AB, por lo que a este genotipo se le denomina genotipo AB. Estos individuos poseen los nueve genes presentes en el haplotipo A, y alguno de los genes específicos del haplotipo B (KIR 2DL2, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5 y 3DS1).

Los haplotipos más frecuentes en la población caucásica se muestran en la siguiente figura.

	Haplotipo KIR										Frecuencia de gen (%)		
	A	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	A + B haplo-types	A haplo-types	B haplo-types
2DL4											100	100	100
2DL5											27.4	0	69.1
3DL1	L	L	L	S	S	S	S	L	L	L	88.8	100	71.7
3DS1											11.2	0	28.3
3DL2											100	100	100
2DL1											96.9	100	92.1
2DL2	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	36.6	0	92.1
2DL3											63.4	100	7.9
2DS1											19.0	0	47.9
2DS2											36.6	0	92.1
2DS3											15.5	0	39.0
2DS4							?				88.8	100	71.7
2DS5											8.7	0	21.9
3DL3											100	100	100
Haplotype frequency (%)	58.1	11.8	8.1	3.4	2.4	2.0	3.0	4.1	2.4	1.0			

Figura 44. Haplotipos KIR más representados en poblaciones caucasoides. Los genes conservados se muestran en marrón. Los genes que pueden estar presentes en ambos haplotipos A y B se muestran en naranja, y los genes que son específicos del grupo B se muestran en azul. (Figura tomada de Parham y col., 2005).

19.4. Genotipos KIR específicos

La presencia o ausencia de cada gen en un individuo determina un perfil genotípico KIR concreto. Existen más de 100 perfiles KIR identificados entre diferentes individuos, algunos de los haplotipos pueden observarse en la figura 45.

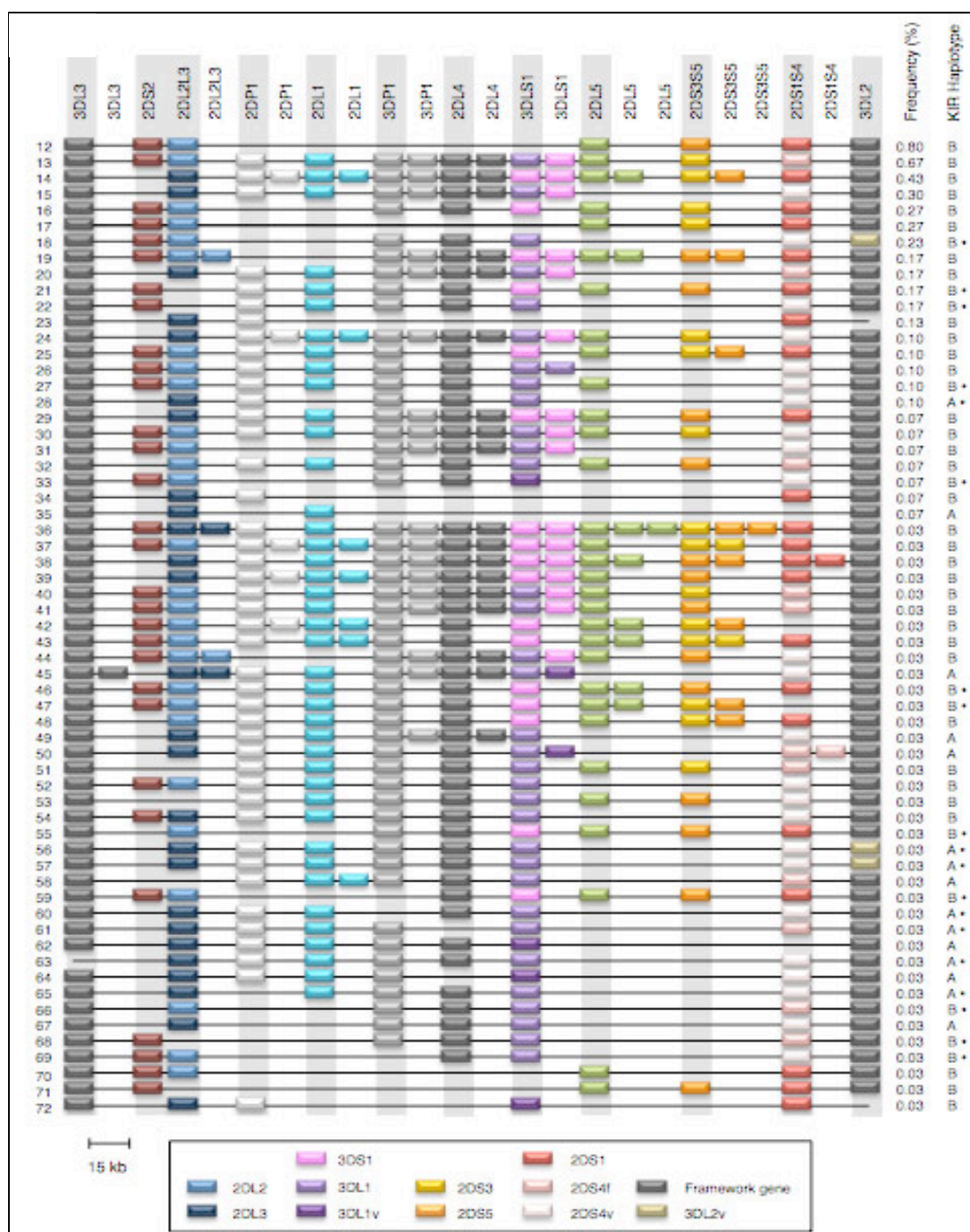


Figura 45. Los distintos haplotipos KIR según el contenido de genes KIR (Figura extraída de Jiang y col., 2012).

Los genes KIR3DL3, 3DP1, 2DL4, y KIR3DL2 están presentes en todos los haplotipos por ser genes constitutivos. Como se observa en la figura 45, hay genes que ocupan el mismo loci en el cromosoma, de tal manera que cuando uno está presente el otro gen está ausente, es decir, son formas alélicas. Esto ocurre con los genes KIR2DL2/L3, KIR2DS3/S5 y KIR3DL1/3DS1.

Cabe destacar ciertos equilibrios de ligamiento entre diferentes genes KIR, de tal manera que cuando un gen está presente o ausente el otro también, y viceversa. Esto ocurre con los pares de genes KIR2DL1/P1, KIR2DL2/S2, KIR3DL1/2DS4 y KIR2DL4/3DP1.

19.5. Expresión de KIR y ligandos KIR

Las moléculas KIR se caracterizan por su expresión estocástica debido a que en un clon de células NK de un individuo puede variar de manera considerable los receptores KIR que expresa en su superficie.

Cada célula debe tener al menos un receptor inhibidor, de manera que cuando no hay una inhibición apropiada ante la unión KIR-ligando, habrá otro tipo de receptor inhibidor que lo compensará (Valiante y col., 1997; Raulet y col., 2001; Shilling y col., 2002b). Los genes KIR de un individuo se expresan de manera que se genera un gran número de diferentes subconjuntos de patrones de expresión de receptores KIR (Uhrberg y col., 2001; Husain y col., 2002). Así se ha visto que, en individuos heterocigotos, los clones de células NK pueden no expresar ningún gen, o expresar uno o ambos genes KIR3DL1 y 3DL2, mientras que, normalmente sí expresa ambos alelos de 2DL4 (Chan y col., 2003). Esta diversidad supone que al menos un clon de células NK puede responder a la regulación inhibitoria de cualquier isotipo de HLA-I (Pietra y col., 2000; Carr y col., 2002; Vilches y col., 2002).

Los ligandos de los receptores KIR son moléculas HLA de clase I (Long y col., 2000; Sawickiy col., 2001), aunque no todos sus ligandos se conocen (Valiante y col., 1997; Biassoni y col., 2003). Todas las moléculas HLA-C son ligandos de receptores KIR, además de algunos HLA-B y HLA-A.

En la figura 46, 47 y 48 se muestran los receptores KIR y sus ligandos HLA conocidos.

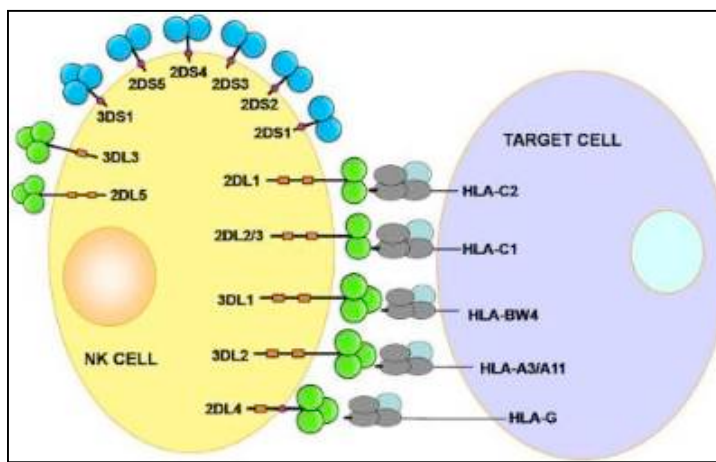


Figura 46. Receptores KIR presentes en la células NK y sus ligandos moléculas HLA correspondientes.

Las moléculas codificadas por genes HLA-C son ligandos para los receptores KIR2D (Boyton y col., 2007). Existen dos grupos de alelos HLA-C definidos por la variación en el aminoácido presente en la posición 80 de la hélice α -1 de la molécula de HLA-C (Biassoni y col., 1995), de manera que HLA-C tiene dos alotipos (Cw grupo 1 y Cw grupo 2).

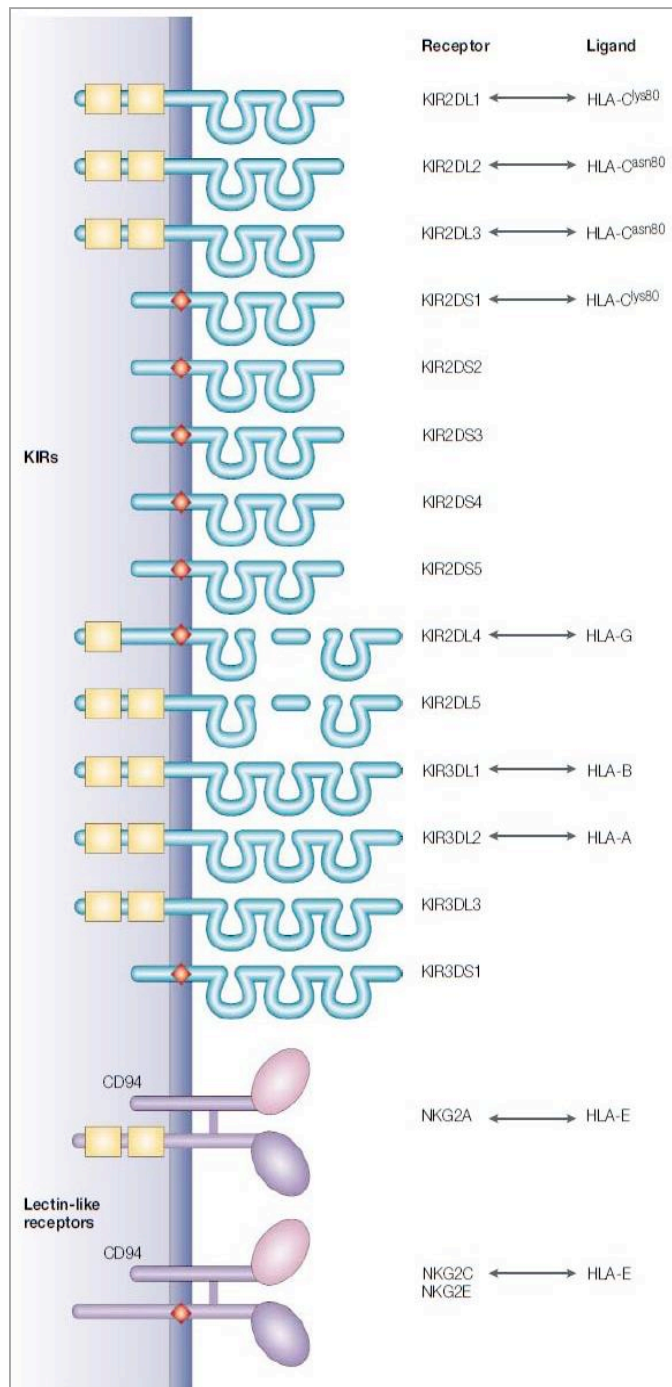


Figura 47. Estructura de los Receptores KIR y sus ligandos HLA-I. La nomenclatura de KIR hace referencia al número de dominios extracelulares (2D o 3D) y a la longitud del tallo citoplasmático (L de largo, S de corto –del inglés, *short*–). Los dominios extracelulares se representan con un bucle o curva de color azul, y los ITIM del tallo citoplasmático de color amarillo. Los residuos cargados positivamente en la región transmembrana se representan como un rombo rojo (Figura tomada de Parham y col., 2003)

HLA-C1 es ligando de KIR2DL2/S2 y KIR2DL3, mientras que HLA-C2 lo es de KIR2DL1/S1, (Colonna y col., 1992; Winter y col., 1997).

KIR3DL1 interactúa con el alotipo HLA-B a través del epítipo Bw4 (Cella y col., 1994), y KIR3DL2 interactúa sólo con algunos alotipos de HLA-A (HLA-A3 y HLA-A11) (Pende y col., 1996; Dohring y col., 1996).

KIR2DL4 probablemente interactúa con HLA-G (Rajagopalan y col., 1999). Los ligandos para KIR2DL5, 2DS3, 2DS5, y 3DL3 no están definidos. Los receptores KIR y sus ligandos se muestra en la figura 46, 47 y 48.

2DL1 and 2DS1	2DL2/3 and 2DS2	3DL1/S1	3DL2	2DL4	2DS4
HLA-C grp 2	HLA-C grp 1	HLA-B Bw4	HLA-A	HLA-G	
C*02	C*01	B*08	A*03		C*04
C*04	C*03	B*13	A*11		
C*05	C*07	B*27			
C*06	C*08	B*44			
		B*51			
		B*52			
		B*53			
		B*57			
		B*58			

Figura 48. Ligandos específicos de receptores KIR.

El grupo C1 se caracteriza por presentar el aminoácido Asparagina (Asn) en la posición 80 e incluye a los alelos HLA-C*01, *03, *07, *08, *12, *14, *16:01.

Por otro lado, el grupo C2 presenta Lisina (Lys) en la posición 80 , y engloba a los alelos HLA-C*02, *04, *05, *06, *15, *16:02, *17, *18 (Figura 49).

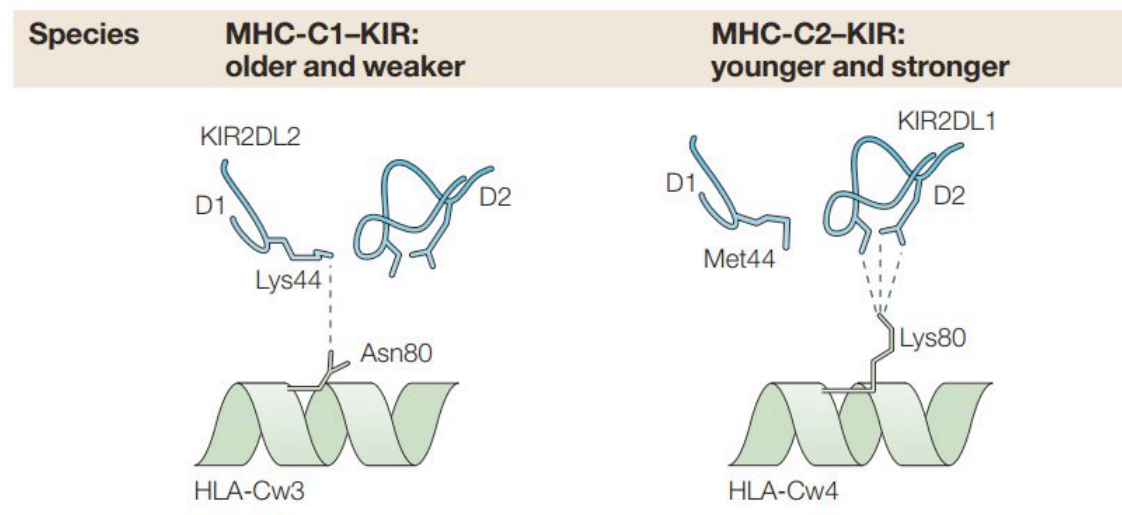


Figura 49. Interacciones de la molécula de HLA-C y los genes KIR. (Figura tomada de Parham y cols 2005).

Aunque los receptores activadores presentan dominios extracelulares estructuralmente idénticos a los receptores inhibidores, KIR2DS1 se une de manera más débil a los alelos C2 que KIR2DL1 y, la unión de los receptores KIR2DS2 con el HLA-C de tipo I no ha podido ser detectada (Parham, 2005b).

La especificidad de la interacción KIR/HLA-C viene definida no sólo por el dimorfismo del HLA-C en posición 80 (Asn vs. Lys), sino también por el dimorfismo correspondiente del receptor KIR en la posición 44 del dominio D1, como se muestra en la figura 49 (Boyington y cols., 2001).

Estudios sobre la afinidad de la interacción KIR-HLA muestran que la unión de las moléculas HLA-C del grupo C2 con su receptor específico (KIR2DL1) es más fuerte y específica que la de las moléculas del grupo C1 con KIR2DL2 o KIR2DL3, como se muestra en Figura 50.

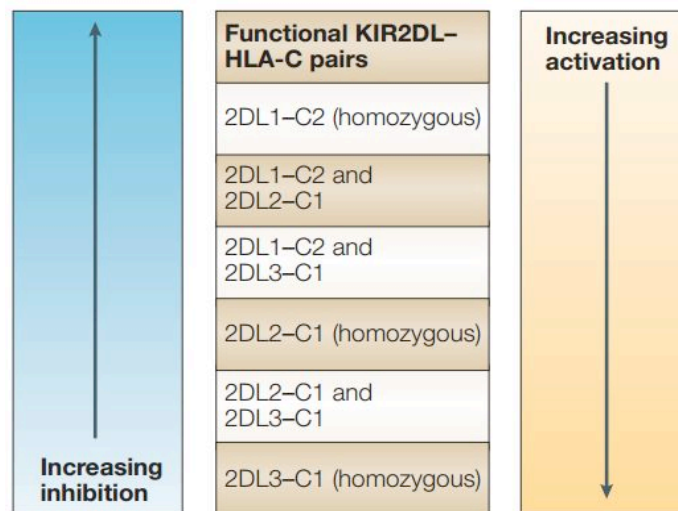


Figura 50. Jerarquía de la inhibición mediada por KIR2DL y sus ligandos. KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 se unen a su correspondiente HLA-C (C1 o C2) con diferente fuerza produciendo una graduación en el incremento de la activación o inhibición NK (Figura tomada de Parhan y col., 2005).

19.6. Localización de los genes KIR centromérico y telomérico

Los genes constitutivos están presentes en la región centromérica (KIR3DL3) y telomérica (KIR3DL2) del haplotipo, así como en la parte central (KIR3DP1 y KIR2DL4) del locus (Pyo y col., 2010). Estos genes constitutivos definen dos regiones con genes que contienen una variación (*gene-content variation*), una en la parte centromérica del locus, y la otra en la parte telomérica. En ambas partes del locus se encuentran dos tipos alternativos de genes que contienen motivos que son cualitativamente diferentes, llamados *Cen-A*, *Cen-B*, *Tel-A* and *Tel-B*. La combinación de las formas *Cen-A* y *Tel-A* pertenecen al haplotipo A, un haplotipo relativamente corto en el que predominan los receptores inhibidores y que son reconocidos por moléculas HLA de clase I. Las otras tres combinaciones *Cen-B* with *Tel-B*, *Cen-B* con *Tel-A*, y *Cen-A* con *Tel-B*, pertenecen al haplotipo B. Los motivos *Cen-B* y *Tel-B* son KIR activadores y han reducido o perdido capacidad para reconocer a HLA-I. Los genes que

contienen una variación de los haplotipos KIR han evolucionado a través de la recombinación asimétrica, la cual está facilitada por las regiones intergenéticas cortas con alta similitud de frecuencia. Complementando este mecanismo está la recombinación homóloga en el centro del locus, que confirma los diferentes motivos *Cen* y *Tel* (Wilson y col., 2000b; Pyo y col., 2010).

KIR2DL2/3 se localiza en la región centromérica: *KIR2DL3* es un gen característica de *Cen-A*, mientras que *KIR2DL2* es característico de *Cen-B*. *KIR2DS2* se encuentra adyacente al gen *KIR2DL2*, tanto en *Cen-A* como en *Cen-B*. Además, *KIR2DL2* y *KIR2DS2* se encuentran en casi total desequilibrio de ligamiento uno con otro y *KIR2DS2* nunca se encuentra adyacente a *KIR2DL3*. Desde un punto de vista funcional es importante apreciar la combinación de *KIR2DS2* y *KIR2DL2* que es el alelo de *KIR2DL3*, una característica que complica la interpretación de muchas enfermedades que se asocian y se correlacionan con *Cen-A/Cen-B*.

Hap.	Cen.	Tel.	Centromeric Region								Telomeric Region						
			3DL3	2DS2	2DL2/3	2DL5B	2DS3/5	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1/S1	2DL5A	2DS3/5	2DS1	2DS4	3DL2
A	Cen-A	Tel-A			2DL3				R								
	Cen-B	Tel-B		2DS2	2DL2				C								
B	Cen-B	Tel-B		2DS2	2DL2				C								
	Cen-B	Tel-A		2DS2	2DL2				C								
	Cen-A	Tel-B			2DL3				R								

Figura 51. Disposición genómica y diversidad genética en el locus KIR humano. Los haplotipos KIR más comunes se representan esquemáticamente. Los rectángulos grises representan la presencia de un gen concreto. *KIR2DS2*, *KIR2DL2*, y *KIR2DL3* se identifican específicamente para resaltar la relación alélica de *KIR2DL2* y *KIR2DL3*, y para demostrar el vínculo entre *KIR2DS2* y *KIR2DL2*. Arginina (R) y cisteína (C) son los residuos codificados en la posición 245 y se identifican para los alotipos *KIR2DL1*. "Hap" es la designación general para haplotipo; "Cen." y "Tel" se utilizan para designar a los segmentos centromérico y telomérico, respectivamente. El sombreado rojo indica un segmento del haplotipo A, el sombreado azul denota un segmento del haplotipo B (Figura tomada de Moesta y Parham 2012).

19.7. Influencia de los genes KIR en las infecciones virales

Las células NK están implicadas en la defensa contra las infecciones virales. Por este motivo, se han realizado diversos estudios que correlacionan los receptores KIR presentes en las células NK solos o en combinación con las moléculas HLA de clase I, con la susceptibilidad, resistencia y cronicidad de infecciones virales (Khakoo y Carrington, 2006).

Una mayor curación del VHC se ha podido observar en individuos que eran homocigotos para KIR2DL3 y HLA-C1. Este estudio concluyó que la débil interacción inhibitorio de KIR2DL3 con C1, aunque no una fuerte interacción inhibitoria de KIR2DL2 y KIR2DL1 con C1 y C1, respectivamente, permite una mayor activación de señales durante la infección viral (Khakoo y col., 2004).

Además se ha descrito un comportamiento similar en la activación versus inhibición de la recurrencia de CMV tras un trasplante de células hematopoyéticas, observándose que a mayor número de KIR activadores menor recurrencia (Chen y col., 2006; Zaia y col., 2009). La recurrencia de CMV también se ha visto reducida en el trasplante de riñón, ante la presencia de múltiples receptores activadores (Stern y col., 2008) y/o en ausencia de ligandos KIR inhibidores (Hadaya y col., 2008). Más específicamente, la ausencia de la interacción de KIR2DL1 con C2, y KIR2DL2/L3 con C1, fue el componente principal de esta asociación (Hadaya y col., 2008).

Otros estudios también han observado una asociación entre algunos genes KIR y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), como en el caso de KIR3DL1/S1 y HLA-B, cuya presencia retrasa la progresión a SIDA (Martin y col., 2002; Alter y col., 2007).

—— JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

2. Justificación del estudio

El consumo de bebidas alcohólicas es actualmente uno de los principales factores relacionados con el estado de salud de los individuos, otros factores condicionantes son el estilo de vida, consumo de tabaco y de otras drogas, la actividad física y los factores relacionados con la alimentación y la nutrición, constituyendo uno de los principales determinantes de la salud, desde una perspectiva epidemiológica del fenómeno salud-enfermedad.

España es uno de los países donde el consumo de bebidas alcohólicas y los problemas relacionados con el mismo adquieren una gran importancia, no sólo por el alto nivel de producción de algunos tipos de bebidas alcohólicas, sino también por la elevada prevalencia de su consumo, el amplio arraigo social que este hábito tiene en nuestras comunidades y la percepción generalizada de que el alcohol, o al menos ciertos tipos de bebidas alcohólicas, forman parte del patrón alimentario y dietético de nuestra sociedad (Rehm y col., 2012; Rehm y col., 2013; Gual A., 2006).

El alcohol es la causa más común de cirrosis en el mundo occidental, esta enfermedad crónica del hígado es una indicación bien establecida de trasplante hepático. La Región de Murcia a través de las actuaciones del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca es pionera en la realización de trasplantes hepáticos (RETH, 2012). Su realización supone un gran gasto sanitario y humano, por lo tanto puede resultar de interés determinar las principales causas que conducen a su realización. Por ello en este trabajo nos vamos a centrar en estudiar el impacto del consumo de alcohol en el desarrollo de esta hepatopatía alcohólica.

Por otra parte, el consumo crónico de alcohol produce alteraciones de índole diversa tanto en el hígado como en el sistema inmune, y esto propicia en último término múltiples consecuencias patológicas en el paciente que concluye con la pérdida del

hígado. Recientemente, se han observado los efectos del alcohol tanto en la respuesta inmune específica humoral y celular (Williams R y col., 2006; O'Shea RS y col., 2010; Jeong WJ y col., 2008).

Existen diversos estudios que demuestran la participación de la inmunidad innata a través de las células NK, junto con otros linajes celulares hepáticos en el desarrollo y control de los procesos de fibrogénesis hepática. Se piensa que la participación de las células NK en este proceso se realiza a través de receptores de membrana y de moléculas segregadas al espacio extracelular, lo que permite a la célula NK en su conjunto participar en el control y desarrollo de la fibrogénesis (Gao B y col., 2007).

Por otra parte, estudios indican que la presencia de alcohol en el paciente con lesión hepática previa produce una alteración en la expresión de moléculas HLA-C presentes en las células estrelladas hepáticas (CEH) encargadas de la producción de las fibras colágenas (Gao B y col., 2007; Tsukada S y col., 2006).

En la actualidad no existe ningún estudio que analice en pacientes que desarrollan cirrosis alcohólica terminal, la variabilidad de la familia de genes que codifican los receptores KIR (presentes en células NK) ni tampoco de las moléculas HLA-C en presentes en los hepatocitos y en las células estrelladas a pesar de ser puntos claves en el desarrollo de esta enfermedad (Bataller R y col., 2005).

Por todo ello en esta tesis nos hemos planteados los siguientes **objetivos**:

- 1- Realizar un estudio descriptivo de las principales indicaciones a trasplante hepático realizados en la Región de Murcia en un periodo de tiempo comprendido entre 1988 y 2013, centrando nuestro estudio en los pacientes sometidos a trasplante como consecuencia de una cirrosis alcohólica.
- 2- Determinar las principales características clínicas y sociodemográficas de los pacientes trasplantados por cirrosis alcohólica.

- 3- Conocer la frecuencia de trasplantes realizados como consecuencia de una cirrosis alcohólica respecto al resto de indicaciones a trasplante.
- 4- Analizar las principales complicaciones pretrasplante y postrasplante del paciente trasplantado por cirrosis alcohólica, así como, la supervivencia tanto a corto como largo plazo.
- 5- Estudiar la frecuencia de los genes KIR y HLA-C en pacientes con diferentes edades que desarrollan procesos cirróticos en presencia o ausencia de infección viral asociada y todo ello comparando con una población control sana.
- 6- Analizar si existe alguna relación entre los receptores KIR y sus ligandos (moléculas de HLA-C) que condicionen el desarrollo de cirrosis alcohólica en pacientes con diferentes edades y que desarrollan cirrosis alcohólica en presencia y ausencia de infección viral asociada.

En caso de confirmarse la implicación de los genes KIR y HLA-C como dianas moleculares de susceptibilidad o de protección a través de su expresión como receptores KIR y sus ligandos HLA-C, implicándose en los procesos de control y desarrollo de la cirrosis alcohólica, se podrían por una parte desarrollar tratamientos farmacológicos personalizados dirigidos a la modulación de estas moléculas en estos pacientes y por otra parte se podrían establecer protocolos de información, asesoramiento, prevención del paciente alcohólico para evitarle en el futuro el desarrollo de una cirrosis hepática que podría complicarse con la pérdida del hígado.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. Pacientes y métodos

Para la realización del primer capítulo de esta tesis se ha revisado retrospectivamente una serie de 1026 pacientes sometidos a trasplante de hígado en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), entre 1988 y 2013.

Del total de pacientes revisados se seleccionaron posteriormente 303 en los que la indicación de trasplante hepático fue la cirrosis alcohólica.

Para el desarrollo del segundo capítulo de la tesis se seleccionó una cohorte de pacientes con cirrosis alcohólica (n=303) de los cuales 281 correspondía a hombres y 22 a mujeres. Debido al bajo tamaño muestral de mujeres, el análisis se dirigió a estudiar los 281 hombres solamente.

La serie final a estudio quedó integrada por un total de 281 pacientes varones con cirrosis hepática alcohólica. De estos pacientes, 213 (75.8%) cursaron sin infección viral asociada y 68 (24.2%) presentaron infecciones virales concomitantes.

Para el estudio caso-control, se utilizó también un grupo control, constituido por una serie de individuos varones sanos (n=319) equiparables en edad y sexo con el grupo de pacientes. Los individuos controles sanos fueron donantes de órganos de diferentes áreas geográficas de España, con una edad media de 51.10 ± 0.38 años.

Ambos grupos de individuos (pacientes y controles) estaban formados por individuos caucásicos.

Cuando se analiza la media de edad en el total de pacientes con cirrosis alcohólica se observa una frecuencia similar de pacientes en ambos grupos con y sin infección viral, siendo de 53.63 ± 0.495 .

Posteriormente los pacientes se agruparon en dos grupos de edades (≤ 54 años y >54 años) siendo 54 años la **mediana de edad** del total de pacientes con cirrosis

alcohólica fue de 54 años. Este valor de mediana de edad se utilizó para clasificar en dos grupos a los pacientes, de tal manera que se estableció un grupo de pacientes jóvenes cuando tenían menos o igual a 54 años y otro grupo de pacientes añosos cuando su edad era mayor de 54 años.

El esquema de la selección de paciente se muestra en la figura 52.

En todos los pacientes se obtuvo el consentimiento informado (Anexo 1), y se le entregó al paciente un documento informativo (Anexo II), y el comité ético institucional aprobó el protocolo del estudio.

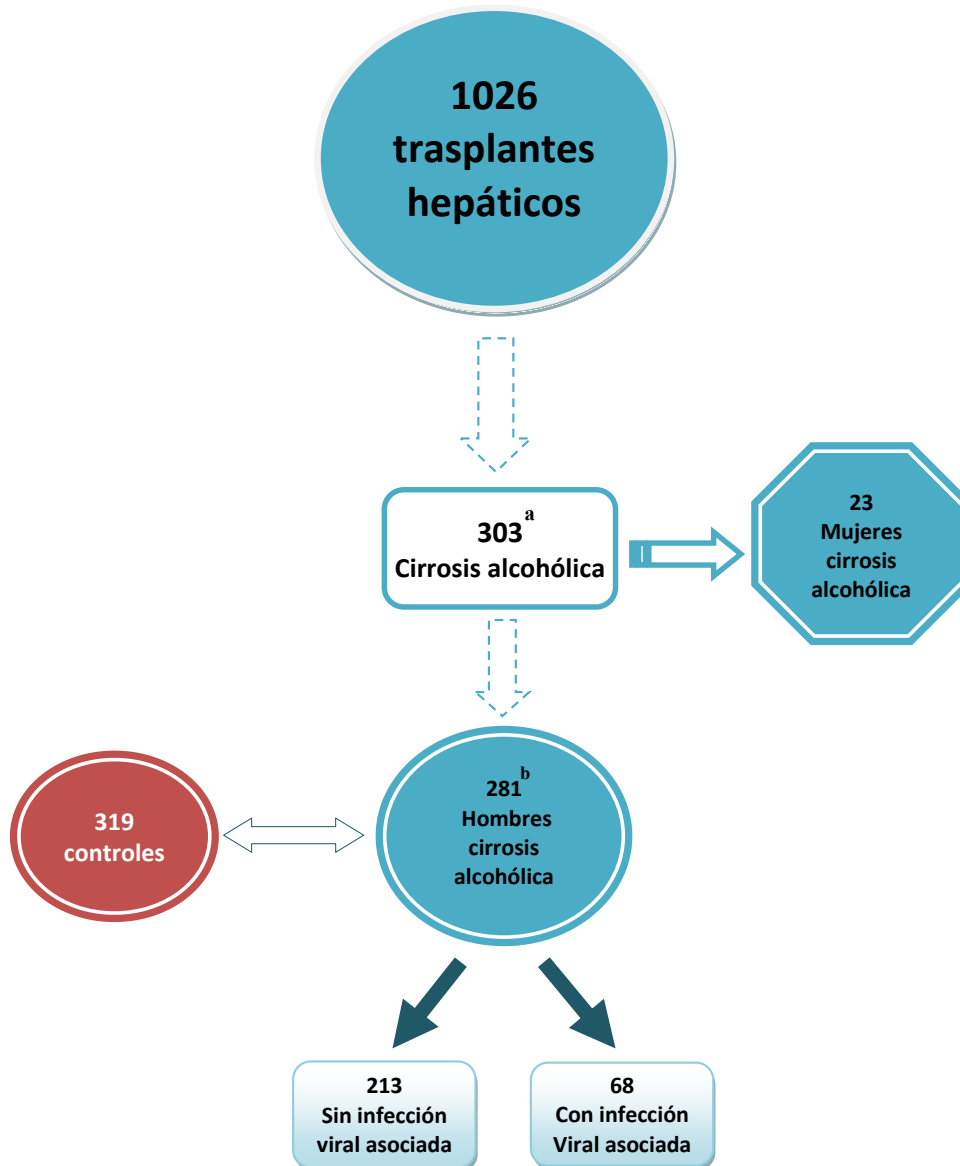


Figura 52. Esquema representativo de los pacientes con cirrosis alcohólica analizados en este estudio. ^a Este grupo de pacientes con cirrosis alcohólica fueron estudiados demográficamente en el capítulo I. ^b Este grupo de pacientes varones con cirrosis alcohólica se analizaron en el capítulo II para estudiar los genes KIR de dicha población.

2. Diagnóstico de cirrosis alcohólica

En este estudio retrospectivo, el diagnóstico de cirrosis alcohólica ha sido determinado según los datos recogidos en las historias clínicas de los pacientes en base

a parámetros clínicos, analíticos y radiológicos (Heidelbaugh y col., 2006). No obstante, debido a que la información dada por el propio paciente respecto al consumo de alcohol se infraestima o es frecuentemente imprecisa, en todos los casos el consumo de alcohol se confirmó a través de familiares o amigos.

Por otro lado, es obligatorio el conocimiento de los hábitos de consumo de alcohol y la fecha de la última ingesta para evaluar la duración de la abstinencia, particularmente, para garantizar la abstinencia mínima de seis meses, la cual una condición para incluir a los pacientes en lista de espera de trasplante hepático (Beresford y col., 2000; Anand y col., 1997). En nuestro hospital, dicha abstinencia se confirma por la afirmación del propio paciente y de sus familiares. Además, se realizan controles de alcoholemia periódicos si su médico lo cree oportuno, y se determina la alcoholemia en las horas previas al trasplante hepático.

Algunos de los pacientes de este estudio fueron diagnosticados de manera causal tras la realización de un TAC o una ecografía, o a partir de una analítica que mostraba datos sugestivos de hepatopatía, puesto que en fases iniciales de cirrosis hepática no existen manifestaciones clínicas o éstas son inespecíficas debido a que la enfermedad está compensada. En otros casos la enfermedad no se diagnosticó hasta el comienzo de la segunda etapa de cirrosis, llamada “cirrosis descompensada”, en la que comienzan a aparecer síntomas derivados de diversas complicaciones (ascitis, hemorragia digestiva alta, encefalopatía, etc.).

3. Determinación de los parámetros clínicos y analíticos

El índice de masa corporal (IMC) de los pacientes fue determinado a partir de los valores de peso y talla usados para el cálculo del IMC en los pacientes con cirrosis en los días previos al trasplante hepático. Además, se clasificaron en dos grupos, según

el peso: pacientes con peso normal, en el que se incluían individuos con un IMC de 18.5 a 25, y pacientes con sobrepeso, que incluía a individuos con un IMC mayor de 25, de acuerdo a la clasificación de la OMS.

Los parámetros clínicos estudiados en esta tesis fueron los siguientes: ascitis, encefalopatía, índice de Child-Pugh y MELD (explicados en el apartado de introducción). Todos estos datos se tomaron unas horas o unos días previos al trasplante.

La presencia de ascitis fue recogida según los datos de la historia clínica, y fue clasificada en los tres grados establecidos de menor a mayor grado (I, II, III) de acuerdo con la clasificación del Club Internacional de Ascitis (Arroyo y col., 1996) y según los datos de la exploración física o pruebas complementarias como la ecografía abdominal (Goldberg y col., 1979).

La encefalopatía también fue recogida de la historia clínica, y clasificada en sus grados correspondientes (I, II, III y IV) definidos en la escala de West Haven para la gradación semicuantitativa de la encefalopatía hepática (Ferenci y col., 2002), según la anamnesis y exploración física.

Tanto la escala de Child-Pugh como la del MELD fueron calculadas con los datos recogidos previos al trasplante. Para la obtención de la escala Child-Pugh se utilizó la albúmina, la bilirrubina, el INR, el grado de ascitis y el grado de encefalopatía (Child y Turcotte., 1984; Pugh y col., 1973). Para la obtención de la puntuación MELD se utilizó la creatinina, la bilirrubina y el INR (Wiesner y col., 2003; Wiesner y col., 2001; Freeman y col., 2002).

En cuanto a los parámetros analíticos o bioquímicos, se recogieron los siguientes datos: creatinina, albúmina, bilirrubina, GOT, GPT, FA, GGT, INR y actividad de protrombina. Todos estos parámetros también fueron determinados en el momento

previo al trasplante o durante las cuatro semanas previas al mismo. Los valores de normalidad para cada uno de ellos fueron los establecidos para cada prueba analítica, tal como se resume en la tabla 17.

Tabla 17. Parámetros analíticos recogidos previamente al trasplante	
Parámetros analíticos	Valores normales
Creatinina (mg/dl)	0.7 – 1.2
Albúmina (g/dl)	3.5 – 5.2
Bilirrubina total (mg/dl)	0.05-1.2
GOT (U/l)	5 – 40
GPT (U/l)	5- 41
FA (U/l)	40 – 130
GGT (U/l)	10 – 71
INR	0.9-1.2
Actividad de protrombina (%)	70 – 100
GOT: Transaminasa glutámico-oxalacética; GPT: Transaminasa glutámico-oxalacética; FA: Fosfatasa alcalina; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; INR: International normalized ratio	

4. Diagnóstico de infecciones virales

La infección por virus de la hepatitis B (VHB) fue determinada midiendo el antígeno superficial (Ag HBs) con un método radioinmunológico (*Soria Biomedica*, Perugia, Italia). Para detectar la presencia de infección de VHC se determinó la el anticuerpo anti-VHC utilizando un inmunoensayo cualitativo (AxSYM HCV v 3.0, Abbott, Wiesbaden-Delkenheim, Alemania), y los casos positivos fueron seguidamente confirmados por inmunotransferencia (RIBA) o RT-PCR (REAL, C.E. Durviz, Valencia, España).

Para detectar la infección por citomegalovirus (CMV), se analizó la presencia de anticuerpos anti-CMV por inmunoensayo (Liason® CMV-IgG, DiaSorin, Saluggia, Italia), y se consideró que había infección por CMV cuando los niveles de anticuerpos IgG eran ≥ 0.6 IU/ml. En todo caso se realizó una nueva confirmación mediante la técnica de PCR en tiempo real (LightCycler® CMV-Quant-kit, Roche, Indianapolis, IN).

5. Obtención y recogida de muestras

El ADN genómico se obtuvo de muestras de sangre periférica en el paciente trasplantado, y de sangre periférica, bazo o nódulos linfáticos en los correspondientes donantes.

La sangre extraída fue recogida en tubo estéril anticoagulado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tal y como se muestra en la figura 53.



Figura 53. Tubo con anticoagulante EDTA, donde se deposita muestra de sangre obtenida de pacientes.

Para la extracción de células a partir de muestras de nódulos linfáticos o bazo se utilizó el siguiente protocolo.

Material:

- Pinzas
- Placa de Petri

- Bisturí
- Suero fisiológico
- Pipetas Pasteur de plástico
- Pipetas de 10ml
- Tubos 50 ml estériles
- Tubos de 15ml estériles
- Criotubos (20)
- Medio de cultivo cardio-condicionado (MCC)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

Procedimiento de obtención y separación de células para el proceso de extracción se siguió el siguiente proceso:

- 1- Colocar el bazo en una placa de Petri añadiéndole suero fisiológico para evitar que se seque.
- 2- Cortar trozos a modo de filetes de 2-3 cm de grosor utilizando el bisturí.
- 3- Pasar uno a uno los trozos a otra placa de Petri, añadiendo suero y presionando el trozo con el bisturí para provocar la salida de las células.
- 4- Pasar la mezcla de células, con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico, a un tubo de 50ml, y completar volumen con suero fisiológico hasta unos 40 ml aproximadamente.
- 5- Tomar otro tubo de 50 ml y le añadimos 15 ml de Ficoll.
- 6- Añadir el suero con las células resbalando por la pared muy lentamente y procurar que no se mezcle y rompa la interfase.
- 7- Centrifugar a 1800 rpm, 25 minutos, a temperatura ambiente.

- 8- Trasferir el de la interfase, conteniendo las células, a los tubos de 15 ml estériles. Completar volumen con suero fisiológico. Usar en este proceso una pipeta Pasteur estéril.
- 9- Centrifugar a 2000 rpm, 10 minutos, a temperatura ambiente.
- 10- Eliminar el sobrenadante por sustracción al vacío, disgregar el botón celular y resuspender en 1 ml de suero salino y después completar volumen.
- 11- Volver a centrifugar, a 1800 rpm, 10 minutos, a temperatura ambiente.
- 12- Repetir el procedimiento anterior de lavado dos veces. Eliminar el sobrenadante por vacío, disgregamos el pellet y añadimos MCC hasta un total de 3 lavados.
- 13- Resuspender en 10 ml de MCC, de ahí cogemos 100 µl para contar las células. Poner el botón celular en 1 ml de MCC y completar hasta 10 ml. Contar las células y referenciarlas a número de células/ml.
- 14- Pasar estos 10 ml a un tubo de 50 ml y añadir 10 ml de DMSO gota a gota sin dejar de agitar el tubo (en hielo).
- 15- Rotular previamente estos 20 tubos con la leyenda: Bazo nº, Fecha , nºde cels x 10⁶.
- 16- Repartir el contenido del tubo de 50 (20 ml) en los 20 tubos de congelación rotulados (1 ml por tubo). Guardar los 20 tubos en una gradilla de corcho en un congelador a -80°C.
- 17- Al día siguiente transferir a IV2 líquido.

Tanto la manipulación de sangre como de bazo o ganglios linfáticos se realiza bajo condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar usando material autoclavado, con guantes y equipamiento de protección adecuado, debido a que muchas de las muestras pueden ser portadoras del virus de la hepatitis, y debido

también a que la congelación debe hacerse estéril por si posteriormente se hicieran análisis funcionales.

6. Extracción de ADN

El ADN fue extraído utilizando el protocolo de extracción automático propuesto por QIAamp ADN blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), según lo recomendado por el fabricante, a partir de 2 ml de sangre periférica. El material utilizado para la extracción automática de ADN fue debidamente esterilizado y autoclavado con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación y eliminar la presencia de ADNasas y proteasas.

Materiales utilizados:

1. Tubos FalconTM de 15 ml de fondo cónico (BD, San Jose, California, EE.UU.)
2. Para la extracción de ADN: QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Alemania), que contiene: Proteasa Qiagen, tampón AL (de lisis), tampón AW1 (de lavado), tampón AW2 (de lavado).

La extracción se realizó usando el equipo automático QIAGEN (Hilden, Alemania), que se muestra en la figura 54, mediante el cual se obtiene ADN altamente purificado a una concentración estándar de 90-150 µg/ml. Este método utiliza una tecnología avanzada basada en la purificación por columnas integradas en un sistema totalmente automatizado, permitiendo una optimización en la concentración del ADN extraído.



Figura 54. Imagen del sistema “QIAcube” (QIAGEN, Hilden, Alemania) utilizado para la extracción automática del ADN.

El proceso de extracción que se siguió, se detalla a continuación y se esquematiza en la figura 55:

1. Se depositan 2 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA, sin que el número de leucocitos exceda de 2×10^7 , en un tubo FalconTM de 15ml.
2. Se añaden 200µL de proteasa Qiagen y 2,4mL de tampón AL, la mezcla se agita y se incuba en un baño a 70°C durante al menos 10 minutos para provocar la lisis celular y extraer con mayor eficacia el ADN nuclear.
3. Tras la incubación se añaden 2mL de etanol al 96%.
4. Se agita hasta conseguir una mezcla homogénea.
5. La mitad del volumen se traspasa a una columna colocada en un tubo de 15ml.
6. Se centrifuga a 3000rpm durante 3 minutos.
7. Se descarta el filtrado y se repite el proceso con el resto de la mezcla.
8. Se añaden 2 ml de tampón AW1 a la columna.
9. Se centrifuga a 5000 rpm durante 1-15 minutos.

10. Se añaden 2 ml de tampón AW2 a la columna.
11. Se centrifuga a 5000 rpm durante 15 minutos.
12. La columna se traspasa a un tubo de 15 ml nuevo.
13. Se añaden 300µL de buffer AE.
14. Se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos
15. Se centrifuga a 5000 rpm durante 2 minutos para obtener el ADN eluido a una concentración entre 90-150 µg/mL.

Una vez extraído el ADN del paciente en un tubo de congelación es etiquetado mediante un código numérico de identificación.

A pesar de la estandarización del método, posteriormente el ADN es cuantificado mediante un espectofotómetro, para determinar exactamente la concentración. Finalmente la concentración se anota en el tubo para su uso posterior.

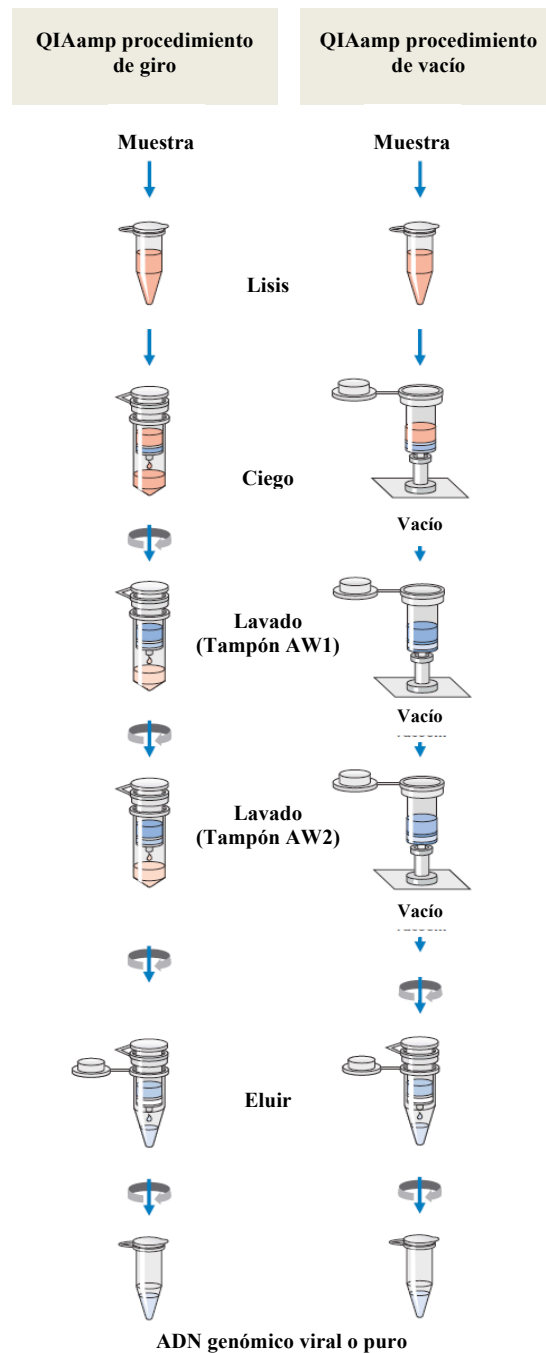


Figura 55. Método de extracción automática de ADN a través del protocolo propuesto por QIAamp ADN blood Mini Kit

7. Análisis de los genes KIR

El análisis de genes KIR en pacientes con cirrosis alcohólica y controles sanos de este estudio se realizó mediante dos tipos de técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR): reacción en cadena de la polimerasa de secuencias específicas de oligonucleótidos (PCR-SSO, del inglés *polymerase chain reaction- Sequence-Specific Oligonucleotide*) y reacción en cadena de la polimerasa con cebadores de frecuencia específica (PCR-SSP, del inglés *Polymerase Chain Reaction-Single Specific Primers*).

La técnica de biología molecular PCR-SSO, se llevó a cabo mediante tecnología Luminex® (*Tepnel Lifecodes*, Stamford, CT, USA), con el equipo que se muestra en la figura 56.



Figura 56. Luminex® technology. Analiza los resultados mediante el programa QuickType software (versión 3.5).

De manera complementaria se utilizó otra técnica de biología molecular que utiliza en este caso, cebadores específicos de secuencias denominada comúnmente PCR-SSP, siguiendo el protocolo descrito por Vilches y col., 2007. Este protocolo a diferencia del anterior no está automatizado. En la tabla 18 se recoge la secuencia de los cebadores utilizados para el genotipado de los genes KIR según este protocolo.

Tabla 18. Secuencia de cebadores utilizados para el genotipado de cada uno de los genes KIR

Controles internos			
<i>FDRA360-C</i>		5'-gaggttaactgtgctcacgaacagc-3'	
<i>RDRA595-C</i>		5'-ggccataccccagtgcttgagaag-3'	
<i>RDRA633-C</i>		5'-cacgttctctgtagtctctggg-3'	
Genes KIR			
Cebadores			
Sentido		Antisentido	
<i>KIR2DL1-F</i>	5'gttggtcagatgcatgtttgaa-3'	<i>KIR2DL1-R</i>	5'-cctgccaggtcttgcg-3'
<i>KIR2DL2-F</i>	5'-aaaccttctctcagccca-3'	<i>KIR2DL2-R</i>	5'-gccctgcagagaacctaca-3'
<i>KIR2DL3-F3</i>	5'-agaccctcaggaggtga-3'	<i>KIR2DL3-R</i>	5'-caggagacaactttgatca-3'
<i>KIR3DL1-F1</i>	5'-ccatygggccatgatgct-3'	Rt1375	
<i>KIR3DL1-F2</i>	5'-tccatcggtcccatgatgtt-3'	<i>KIR3DL1-R</i>	5'-ccacgatgtccagggga-3'
<i>KIR3DL2-F</i>	5'-catgaacgtaggctccg-3'	<i>KIR3DL2-R</i>	5'-gaccacacgcagggcag-3'
<i>KIR2DS1-F(6)1</i>	5'-tctccatcagtcgatgag-3'	<i>KIR2DS1-R</i>	5'-ggcactgggagctgac-3'
<i>KIR2DS1-F(6)2</i>	5'-tctccatcagtcgatgaa-3'		
<i>KIR2DS2-F</i>	5'-tgcacagagaggggaagta-3'	<i>KIR2DS2-R</i>	5'-ccctgcaaggtcttga-3'
<i>KIR2DS3-F</i>	5'-cttgctctgcagctcct-3'	<i>KIR2DS3-R</i>	5'-gcactgtaggttctctct-3'
<i>KIR2DS4-F</i>	5'-ggttcaggcaggagagaat-3'	<i>KIR2DS4-R</i>	5'-ctggaatgttccgkcatg-3'
<i>KIR2DS5-F</i>	5'-agagaggggacgtttaacc-3'	<i>KIR2DS5-R</i>	5'-ctgatagggggagtgagt-3'
<i>KIR3DS1-F1</i>	5'-catcggttccatgatgcg-3'	<i>KIR3DS1-R</i>	5'-ccacgatgtccagggga-3'
<i>KIR3DS1-F2</i>	5'-catcagttccatgatgcg-3'		
<i>KIR2DP1-F</i>	5'-cgacactttgcacctcac-3'	<i>KIR2DP1-R</i>	5'-gggagctgacaactgatg-3'
<i>KIR3DL3-F</i>	5'-aatgttggtcagatgcag-3'	<i>KIR3DL3-R</i>	5'-gcygacaactcataggga-3'
<i>KIR3DX1-F</i>	5'-tttctgtgggccgtgcaa-3'	<i>KIR3DX1-R</i>	5'-gtcactgggggcttatag-3'
<i>KIR2DL4-F</i>	5'-tcaggacaagcccttctgc-3'	<i>KIR2DL4-R</i>	5'-ggacagggaccccatcttfc-3'
<i>KIR2DL5-F</i>	5'-atctatccaggagggggag-3'	<i>KIR2DL5-R</i>	5'-catagggtgagtcatggag-3'
<i>KIR3DP1-F1</i>	5'-gtgtggtaggagccttag-3'	<i>KIR3DP1-R</i>	5'-gaaaacggtgttccggaatac-3'
<i>KIR3DP1-F2</i>	5'-gtacgtcaccctcccatgatga-3'		

Estas secuencias se han obtenido del protocolo descrito por Vilches y col., 2007. A la izquierda están representados los cebadores sentido (F, del inglés, *Foward*) y en la columna de la derecha los antisentido (R, del inglés, *Reverse*).

Ambos métodos son capaces de identificar con la misma precisión la presencia de los genes KIR KIR2DL1-5 inhibidores, KIR3DL1-3 y KIR2DS1-S5 activadores, así como a los genes KIR3DS1 y KIR2DL4, y los pseudogenes KIR2DP1 y KIR3DP1. No obstante el método de PCR-SSO permite conocer determinadas formas alélicas de KIR2DS4.

Los genes KIR2DL5A y KIR2DL5B no pudieron ser discriminados con estos sistemas de tipaje.

7.1. Análisis de los genes KIR por PCR-SSO en tecnología Luminex®

El procedimiento de tipificación mediante tecnología Luminex (*Tepnel, Life codes*) se basa en la hibridación con sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia del ADN monocatenario.

Cada una de las distintas sondas puede ser homóloga de una secuencia del ADN amplificado exclusiva de un alelo o grupo de alelos. Dicho de otro modo, estas sondas se han creado para que cada una de ellas hibride preferentemente con una región complementaria que puede estar presente o no en el ADN amplificado. Además, el ADN amplificado hibrida también con una o más sondas de consenso homólogas a secuencias presentes en todos los alelos de un locus.

La tipificación con este método puede verse afectada por el tipo de material biológico, método de purificación y la cantidad e integridad del ADN genómico. Por consiguiente, la señal obtenida con la(s) sonda(s) consenso puede servir de indicador del éxito de la amplificación e hibridación. Puede utilizarse, así mismo, para normalizar la señal de las sondas alelo específicas y efectuar los ajustes necesarios según las variaciones de la cantidad de producto amplificado en la reacción de hibridación.

El análisis de los resultados de la tipificación puede aplicarse para determinar la presencia o ausencia de secuencias concretas de ADN en el producto amplificado que permiten identificar los posibles alelos en la muestra.

7.1.1. Fundamento de la técnica

Mediante esta técnica las sondas se unen a microesferas Luminex ideadas para utilizarse con el equipo. Se pueden mezclar hasta 100 poblaciones diferentes de microesferas Luminex y se les puede analizar porque cada una de ellas se distingue por su color de fluorescencia característico. A cada microesfera de color puede unirse una sonda diferente. Por consiguiente, en una mezcla compuesta por varias sondas es posible distinguir unas de otras por su unión a microesferas de un color determinado. El equipo Luminex Instrument también mide las cantidades relativas de producto de PCR marcado que hibrida con cada microesfera Luminex. De esta manera, al igual que ocurre con otros métodos SSO, la señal relativa obtenida con las sondas SSO en el ensayo (LIFECODES) puede utilizarse para asignar a las sondas una reactividad positiva o negativa con la muestra de ADN amplificado. Esto, a su vez, ofrece la información necesaria para determinar el genotipo KIR de la muestra.

Los materiales utilizados para realizar el genotipado de KIR mediante Luminex® fueron:

- Equipo de genotipaje de KIR que incluye: primers (K1 y K2), tampón de dilución, los *beads* (microesferas) y estreptavidina.
- Micropipetas y puntas estériles.
- Etanol al 70%
- Agua libre de nucleasas
- Solución emulsionante
- Tubos de PCR

- Termociclador
- Taq proteasa (*Hot Start*) de Promega
- Placas de 96 pocillos de lectura
- Tubos eppendorfs de 1,5 ml estériles

7.1.2. Protocolo de PCR-SSO

Los pasos llevados a cabo en el laboratorio fueron:

A) AMPLIFICACIÓN DEL ADN

En función de la cantidad de muestras y del locus a analizar, se calculó la cantidad de cada uno de los reactivos que había que usar. Se producen dos reacciones para la amplificación, según las mezclas de cebadores, se producen dos tipos de reacciones (Tabla 19).

Tabla 19. Amplificación del ADN mediante la utilización de dos cebadores

Cebador Mix 1. Amplificaciones de los exones (del 4 al 11) de los genes KIR										
3DP1	2DS2	3DS3	2DS5	2DP1	3DS1	3DL1	2DS1	2DL1	2DS4	2DL2*1-3
Cebador Mix 2. Amplificaciones de los exones (del 5 al 8 de 7) de los genes KIR										
3DL3	2DL2	3DL2	2DL4	2DS4*003	2DL3	2DL5				

La mezcla de cebadores (master mix) se prepara según se resume en la tabla 20.

Tabla 20. Concentraciones de los reactivos para realizar una master mix

Nº muestras	Master mix (primers)	Muestra (ADN)	TAQ	H ₂ O sin nucleasas
1	3µl	1µl (50ng/µl)	0,1µl	5,9µl

Todo debe realizarse por duplicado (para corregir errores de pipeteo), y la concentración de ADN de las muestras, se debe ajustar a un valor entre 30 y 50 ng/μl mediante diluciones.

Después se procede a:

1. Mezclar bien mediante agitador (tipo vortex) tanto las muestras como las Master mix.
2. Preparar las mezclas (MIX) según la tabla.
3. Añadir 1μl de ADN a cada pocillo (por duplicado, dividir la placa o poner otra fila de tubos).
4. Añadir 9 μl de MIX a cada tubo (que ya contiene la muestra).
5. Meter los tubos/placa en el termociclador (bien rotulados) y cerrarlos bien.
6. Programar y realizar de amplificación en modo PCR, según las condiciones que se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Programa de amplificación por PCR

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	2 min	1
94°C	30 seg	40
59°C	90 seg	
72°C	30 seg	
72°C	15 min	1
4°C	∞	

B) HIBRIDACIÓN

1. Pre-calentar las esferas 5-10 min a 55- 60°C.
2. Pasar las esferas por el ultrasonidos durante 1 minuto.

3. Agitar las esferas.
4. Añadir a cada pocillo de la placa de lectura 2.5 µl de ADN amplificado y 7.5 µl de esferas. Los 2,5µl de ADN estarán previamente añadidos en los pocillos.
5. Agitar las esferas después de ser añadidas a cada fila de ocho pocillos.
6. Sellar bien la placa con una pegatina antes de meterla al termociclador.

Recordar que las muestras van por duplicado (K1 y K2) así que habrá que hacer el doble de mezcla.

C) LECTURA DE RESULTADOS

Los resultados analizaron usando el programa Quick-Type (versión 3.5).

7. Proceso de hibridación:

Las muestras hibridan en el termociclador a 56° durante 20 minutos. Al terminar los 20 minutos de hibridación y manteniendo la placa en el termociclador a esa temperatura, preparar la mezcla de la solución de dilución y la estreptavidina para (n+1) muestras.

8. Añadir 100 µl de solución de dilución 0,4µl estreptavidina a cada pocillo.
9. Sacar inmediatamente las muestras del termociclador.
10. Meter las muestras en el analizador (que estará previamente encendido al menos una hora antes). Los resultados obtenidos pueden ser observados en el Anexo III (Modelo de informe de Luminex®).

7.2. Análisis de los genes KIR mediante PCR-SSP

Además del protocolo descrito anteriormente, se utilizó de manera complementaria el protocolo descrito por Vilches y col., 2007 utilizando PCR con cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP).

Esta técnica consiste en la amplificación de ADN con cebadores específicos de secuencia, por lo que para cada locus de KIR se usa un conjunto de cebadores cuyas secuencias son capaces de discriminar las diferentes variantes genéticas, de tal forma que solo se produce la reacción de amplificación cuando el ADN contiene el gen que corresponde al grupo de cebadores de la reacción. El fundamento de esta técnica se resume en la figura 57 y 58.

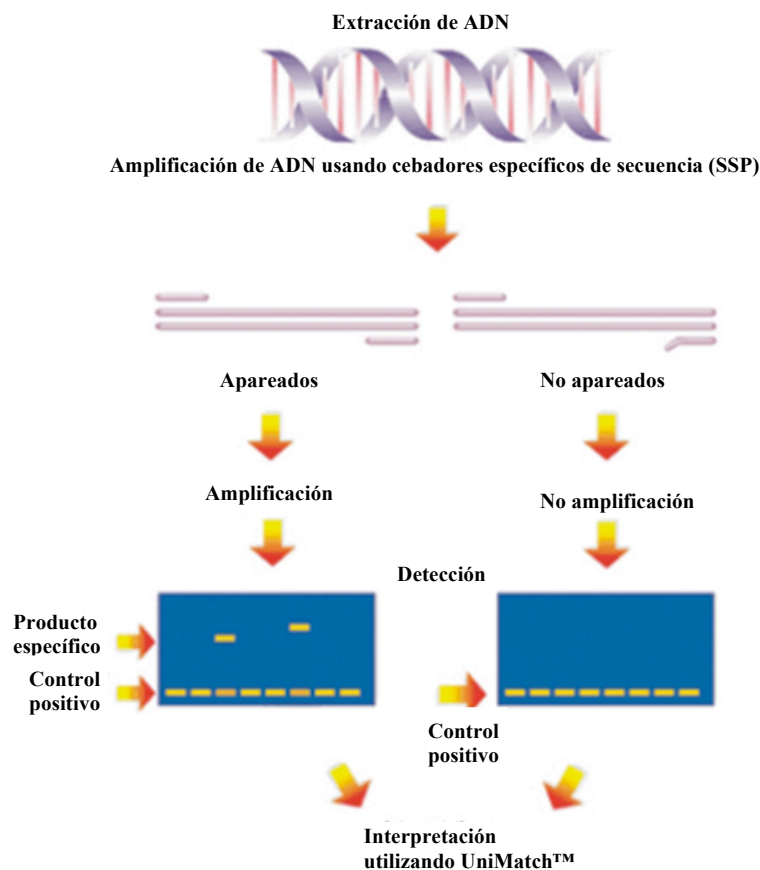


Figura 57. Esquema del tipaje de KIR mediante PCR-SSP

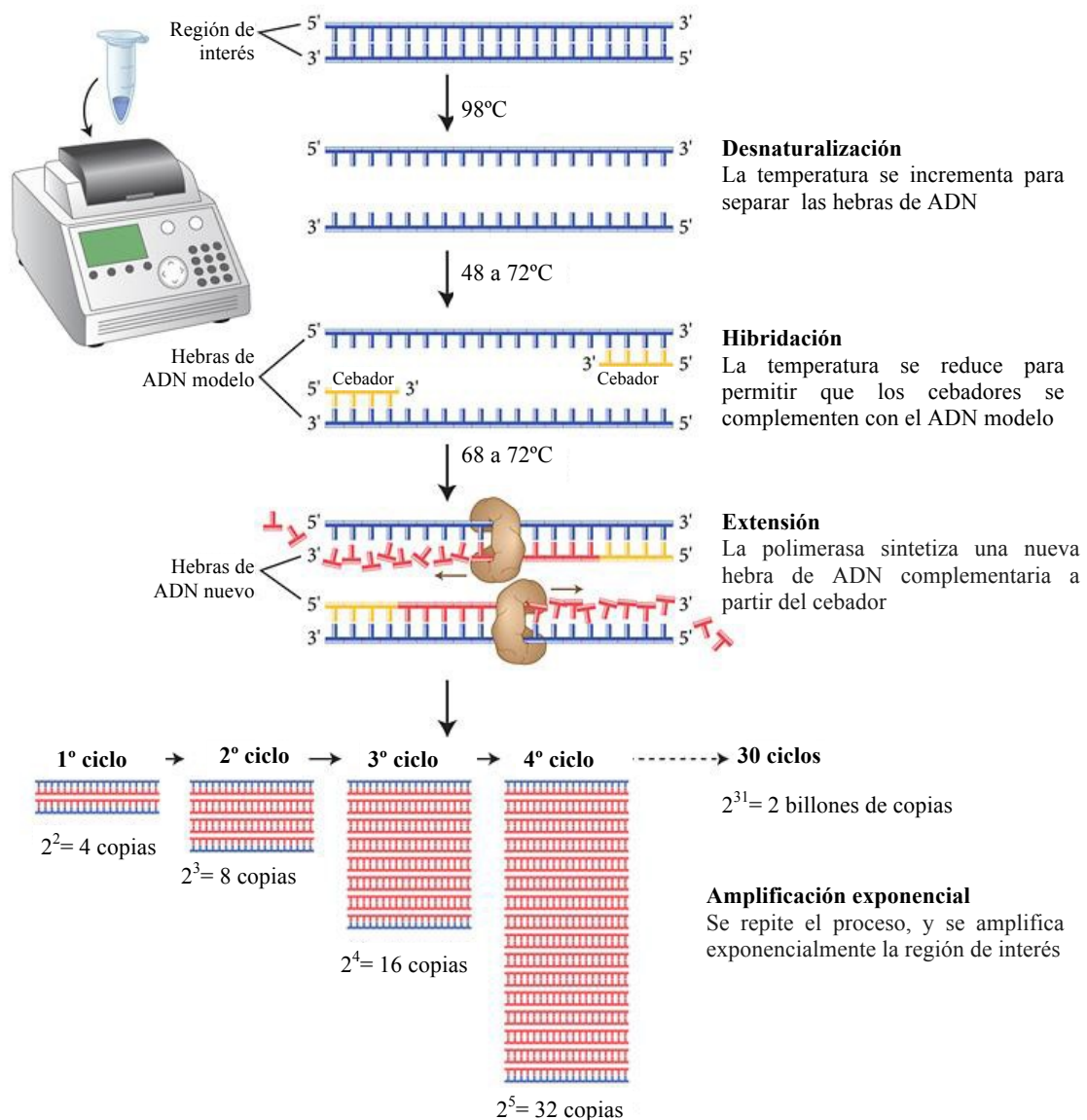


Figura 58. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa

Por otro lado, en la figura 59 se muestra de manera esquemática las localizaciones de los cebadores utilizados para la identificar y amplificar cada uno de los genes KIR en el genoma. Como puede observarse en el esquema, la mayoría de cebadores han sido diseñados sobre secuencias génicas que codifican los dominios extracelulares D1 y D2. En el caso de KIR2DL4, sus cebadores amplifican secuencias D0 y del gen KIR2DL3 también para su región citoplásmica.

El esquema mostrado en la figura 59 no está en escala ya que las zonas intrónicas han sido reducidas. En este nuevo método, la amplificación intrónica se evita, excepto para el pseudogen KIR3DP1. En todos los casos se reduce de manera considerable la longitud del amplicón a menos de 200 pares de bases.

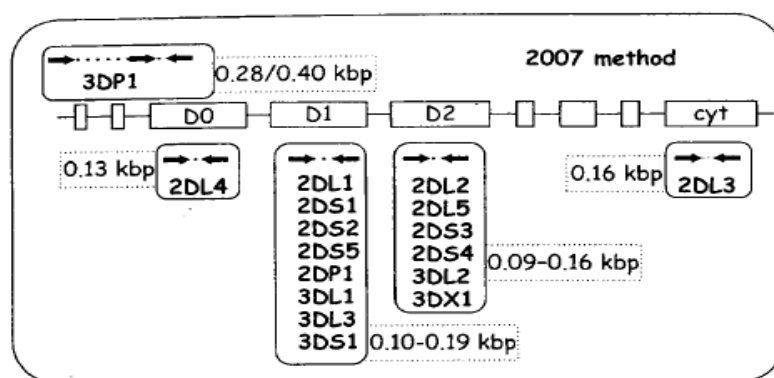


Figura 59. Esquema representativo de los distintos dominios estructurales de los genes KIR con la localización de los diferentes cebadores utilizados para la amplificación de cada uno de los genes KIR analizados (Vilches y col., 2007).

Para cada individuo se realizan 16 reacciones independientes de PCR-SSP, amplificando cada gen en un pocillo, usando placas de 96 pocillos. Las placas se organizan para poder genotipar los distintos pacientes, según se representa en la figura 60.

En cada reacción de amplificación se utilizan entre dos y cuatro cebadores específicos dependiendo del tipo de gen KIR que se quiera amplificar. Cada combinación de cebadores (sentido y antisentido) son específicos para cada gen KIR.

En todas las reacciones se emplea un control interno positivo consistente en la adicción de un par de cebadores específicos.

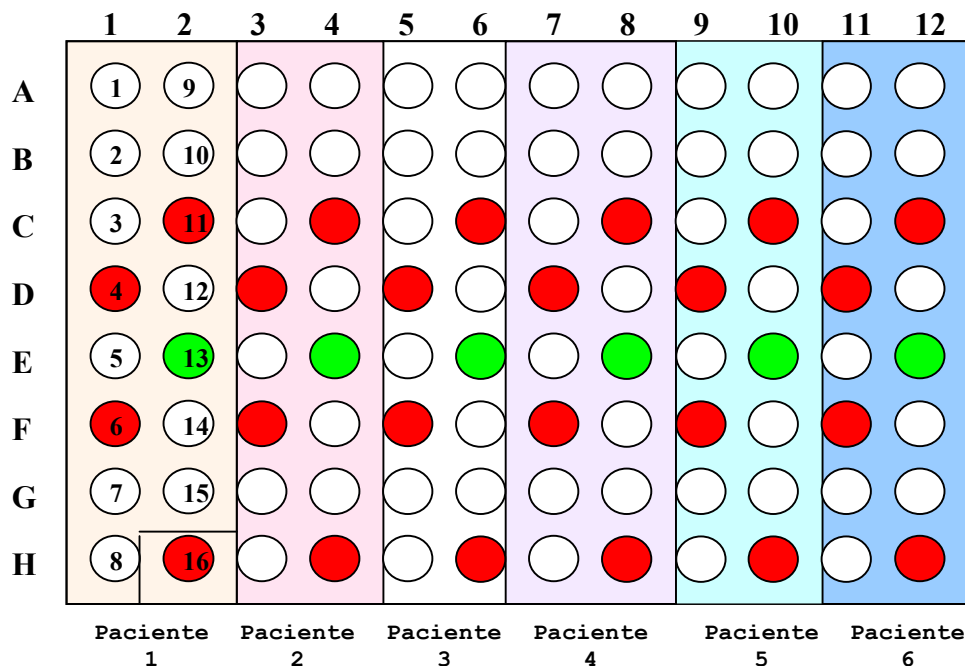


Figura 60. Esquema representativo de una placa de 96 pocillos utilizada para el genotipaje de los 16 genes KIR en un total de 6 pacientes. En cada uno de los pocillos (representado por círculos) se amplifica cada uno de los siguientes genes KIR: 1, *KIR2DL1*; 2, *KIR2DL2*; 3, *KIR2DL3*; 4, *KIR3DL1*; 5, *KIR3DL2*; 6, *KIR2DS1*; 7, *KIR2DS2*; 8, *KIR2DS3*; 9, *KIR2DS4*; 10, *KIR2DS5*; 11, *KIR3DS1*; 12, *KIR2DP1*; 13, *KIR3DL3* y *KIR3DX1*; 14, *KIR2DL4*; 15, *KIR2DL5*; 16, *KIR3DP1*.

Esta técnica permite genotipar 16 genes KIR, de los cuales 8 son genes inhibidores (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3/3DX1*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*), 6 son genes activadores (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*) y dos son considerados pseudogenes (*KIR2DP1*, *KIR3DP1*) por no haberse identificado ni sus transcritos de ARN ni proteínas.

Para cada reacción se prepara un volumen final de 25µl que contiene 100ng de ADN genómico extraído tal y como se comentó anteriormente.

El ADN se amplifica en 10µl de tampón PCR (67 mM Tris-HCl, pH8.8, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgCl₂, 0.01%Tween-20, 100µM dNTPs) conteniendo 0.3 U de Taq

polimerasa (Eco Taq; Ecogen SRL, Barcelona , Spain). Posteriormente se realizó la PCR-SSP, bajo las siguientes condiciones resumidas en la tabla 22.

Tabla 22. Programa de amplificación utilizado para el genotipaje KIR

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	2 min	1
94°C	10 seg	10
65°C	40 seg	
94°C	20 seg	20
61°C	20 seg	
72°C	30 min	

Los termocicladores utilizados fueron ABI9700 y ABI9902 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Finalmente, del producto amplificado, se tomaron 10 ul a los que se añadió el tampón de carga a una proporción 1:3. El amplificado se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.

Los controles internos utilizados para cada una de las reacciones se indican en la tabla 23.

Una vez realizada la electroforesis, el gel de agarosa se visualiza en un transiluminador ultravioleta, obteniéndose la imagen mostrada en la figura 61. En esta figura se muestra el genotipo KIR de un individuo con genotipo AB1.

Tabla 23. Cebadores sentido y antisentido utilizados como controles internos según el gen KIR amplificado

Reacciones para los genes KIR del 1-15	Amplitud del producto – 283 bp
FDRA360	5'–gaggtaactgtgctcacgaacagc–3'
RDRA595	5'–ggccataccccagtgttgagaag–3'
Reacción 16 para los genes KIR del	amplitud del producto – 608 bp
FDRA360	5'–gaggtaactgtgctcacgaacagc–3'
RDRA633	5'–cacgttctctgtagtctctggg–3'

FDRA: sentido; RDRA: antisentido;

Reacciones 1, KIR2DL1; 2, KIR2DL2; 3, KIR2DL3; 4, KIR3DL1; 5, KIR3DL2; 6, KIR2DS1; 7, KIR2DS2; 8, KIR2DS3; 9, KIR2DS4; 10, KIR2DS5; 11, KIR3DS1; 12, KIR2DP1; 13, KIR3DL3 y KIR3DX1; 14, KIR2DL4; 15, KIR2DL5; 16, KIR3DP1

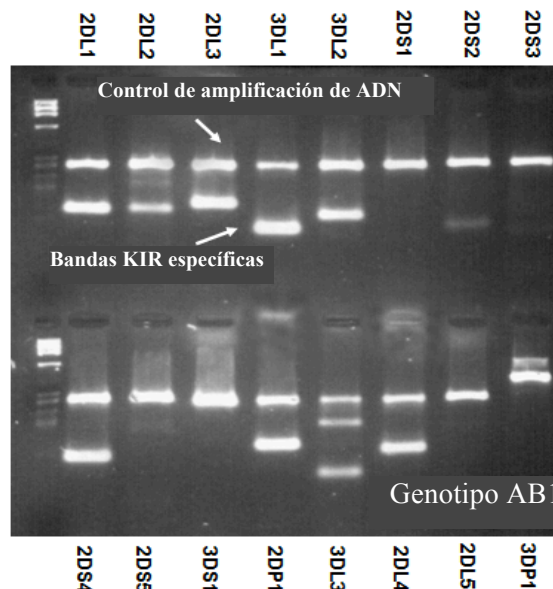


Figura 61. Fotografía de un del gel de agarosa al 3% mostrando el genotipo KIR tipo AB1 de un individuo. En el lado izquierdo se muestra el marcador de peso molecular utilizado (Φ X174). Las bandas superiores corresponden a los a los controles internos de cada uno de los genes KIR analizados, y la existencia de una banda inferior muestra la positividad de la reacción.

El análisis de las distintas bandas se realizó comprobando que el tamaño de las bandas que se observan en el gel de agarosa corresponden al tamaño especificado para cada gen en la figura 62, evitando de este modo interpretar como positivas bandas que no corresponden a su tamaño concreto.

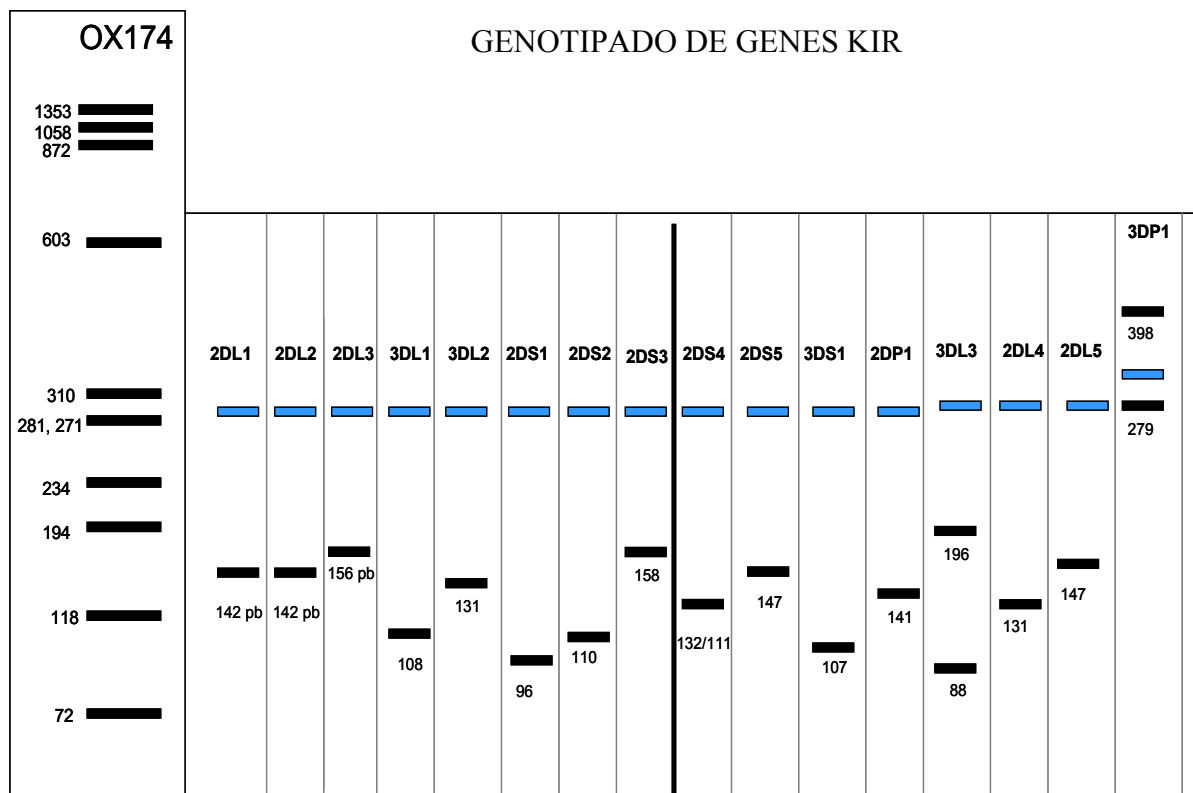


Figura 62. Esquema representativo de la relación de tamaño de los diferentes productos de reacción de la PCR-SSP obtenidos para cada uno de los genes KIR analizados.

En la parte izquierda de la figura 62, se representa el diagrama de bandas del marcador de peso molecular ϕ X74. En la parte derecha de la figura se representan las posiciones y los tamaños de cada uno de los genes KIR amplificados.

Las bandas azules indican la posición y el tamaño de los controles internos de cada una de las reacciones. Las bandas negras representan los amplificadores

correspondientes a cada uno de los genes KIR. En la parte inferior se indica el peso molecular en pares de bases (pb) estimado para cada amplificado.

8. Análisis de los genotipos KIR

El repertorio genes KIRs que porta un individuo concreto constituye su “genotipo KIR”, y es variable de un individuo a otro. En este estudio los genes KIR han sido analizados de manera general, teniendo en consideración la presencia o ausencia de cada uno de los 16 genes, y de manera especial, teniendo en cuenta algunas combinaciones entre ellos. Ambos tipos de análisis se describen a continuación.

8.1. Análisis de genotipos KIR específicos

Los genotipos específicos KIR fueron definidos y clasificados utilizando como referencia la clasificación numérica establecida en la web de frecuencias de alelos (<http://www.allelefrequencies.net>) de tal manera que cada genotipo fue nombrado según el número de genotipo (ID) definido por esta web.

Para su clasificación ID se tuvieron en cuenta los dos pseudogenes (KIR2PD1 y KIR3DP1).

8.2. Análisis de genotipos KIR generales

El contenido genético KIR fue usado para inferir el tipo de haplotipo KIR A y B, y para así asignar los tres genotipos AA, AB, y BB a cada persona (Middleton y col., 2003).

Los individuos portadores solamente de genes del haplotipo A, tales como KIR3DL3, 2DL3, 2DL1, 2DP1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 2DS4, 3DL2 fueron considerados homocigotos para dicho haplotipo y por lo tanto clasificadas como genotipo AA (Middleton y col., 2003). Por otra parte, los individuos que carecían de

los genes KIR2DL1, 2DL3, 3DL1, y 2DS4, fueron considerados como portadores homocigotos del haplotipo B clasificando al individuo con el genotipo BB.

El resto de individuos fueron considerados portadores heterocigotos de ambos haplotipos (genotipo AB). Por lo tanto los individuos con el genotipo AB poseen los nueve genes del haplotipo A, así como uno o más genes específicos del haplotipo B (KIR2DL2, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5 y 3DS1). En determinados análisis de esta tesis los genotipos AB y BB fueron considerados dentro de un mismo haplogrupo y referenciados como genotipo BX (McQueen y col., 2007).

En algunos de los análisis realizados en este estudio, los genes KIR se han ordenado y clasificado según su posición centromérica y telomérica (Hou L y col., 2012; Pyo y col., 2010), tal y como se describe anteriormente en la introducción de esta tesis.

9. Genotipado de ligandos HLA-C de clase I

Los alelos que son ligandos HLAC de clase I se tiparon por técnica de PCR-SSO y por PCR-SSE reversa.

9.1. Genotipado de HLA-C por PCR-SSO

El genotipado de alelos de HLA-C clase I (A, B, C) fue llevado a cabo por la técnica de luminex de reacción en cadena de la polimerasa, usando oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO), mediante tecnología *Luminex®* y *Dynal Biotech* (ASA, Oslo, Noruega). Esta técnica permite identificar el dimorfismo en la posición 80 de la hélice- α 1 de los alelos de este locus.

Los alelos HLA-C fueron asignados a dos grupos principales: C1, para los alelos HLA-C*01, C*03, C*07, C*08, C*12, C*14 y C*16:01 que presentan el aminoácido asparagina en la posición 80 de la hélice- α 1, y C2, para los alelos HLA-C*02, C*04,

C*05, C*06, C*15, C*16:02, C*17 y C*18 que presentan el aminoácido lisina en la posición 80 de la hélice- α 1.

Considerando estos grupos de alelos HLA-C, tanto receptores como donantes se clasificaron en: C1/C1 homocigotos, individuos que solo portaban alelos del grupo C1, C2/C2 homocigotos, individuos portadores de alelos del grupo C2, e individuos C1/C2 heterocigotos, que eran portadores de alelos de HLA-C de ambos grupos (Moya-Quiles y col., 2003; López-Alvarez y col., 2009).

9.2. Análisis de genotipaje de HLA-C por PCR-SSO reversa

Este método determina el genotipo de HLA-C a través de tres procesos:

- 1) Amplificación de una región del ADN específica del locus mediante PCR, en este caso HLA-C.
- 2) Hibridación del segmento amplificado con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica inmovilizadas en una membrana de nylon (soporte sólido).
- 3) Detección del producto amplificado unido a la sonda mediante método colorimétrico. El proceso se resume en la figura 63.

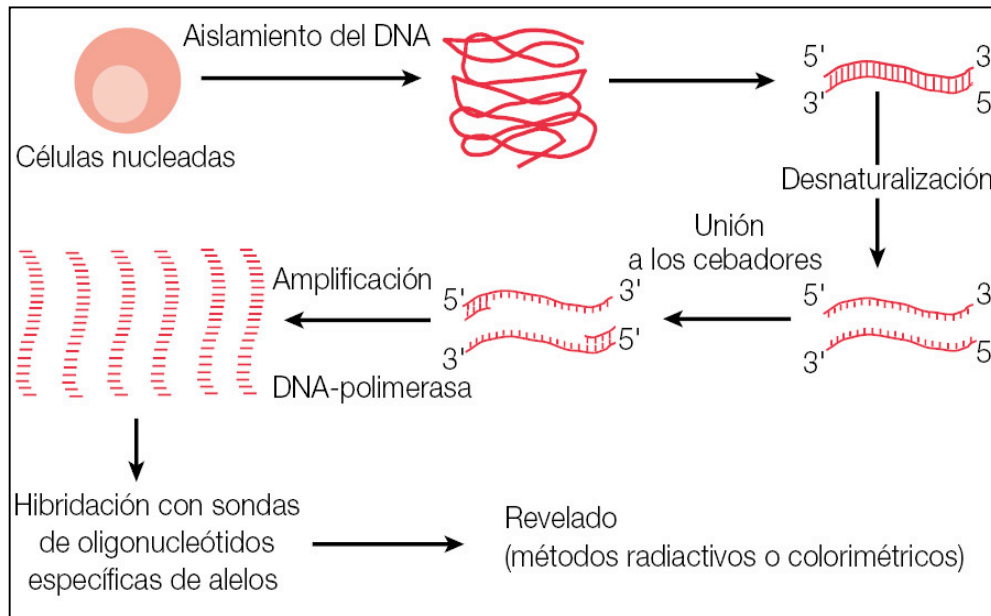


Figura 63. Esquema del tipaje de HLA-C mediante PCR-SSO reversa. Esta prueba consiste en la obtención de una pequeña cantidad de ADN utilizando una ADN-polimerasa, en ciclos repetidos de desnaturalización para conseguir la separación de las hebras de ADN, y de síntesis de la cadena complementaria, que forma millones de copias. Tras este proceso se utilizan sondas de oligonucleótidos específicos de diferentes alelos HLA para detectar las especificidades alélicas presentes en el ADN estudiado (Figura extraída de Inmunobiología del trasplante. Estudios inmunológicos del donante y receptor del trasplante. Juan Carlos Ruiz San Millán, Manuel Arias Rodríguez, Marcos López Hoyos, José M. Pastor Martínez. 2012).

Las microesferas llevan fijadas las sondas de ADN características. Tras la amplificación por PCR, el ADN a estudio se hibrida a una microesfera, y se marca con un fluorocromo. Dado que cada microesfera tiene un color característico, la combinación del color específico de la esfera y del fluorocromo del ADN permite la lectura mediante un citómetro de flujo, la cual será interpretada por el programa de tipado (Erlich y col 2001). Este proceso se muestra en la figura 64.

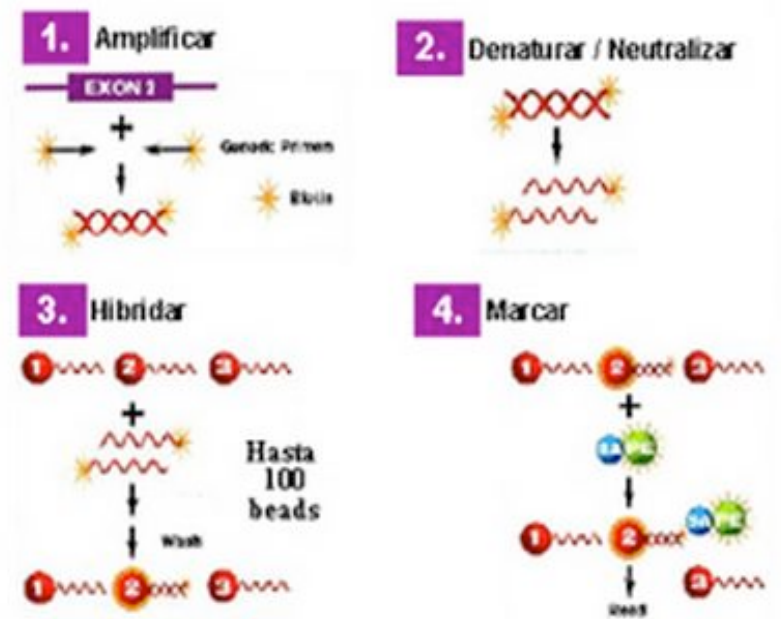


Figura 64. Proceso del genotipado de HLA-C por PCR-SSO reversa. Figura extraída de <http://www.rafer.es/rsso.html>

El dispositivo utilizado para realizar el análisis de alelos de HLA-C mediante la técnica de PCR-SSO reversa, ha sido el kit HLA-C Dynal RELI-SSO (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.), utilizando los siguientes materiales:

- Mezcla principal para HLA-C: es una solución de Tris- HCL que contiene glicerol al 30%, KCL 100mM, dATP, dCTP y dGTP a 400uM, dUTP 800uM, cebadores biotinilados (0,5 uM), AmpliTaq® (Taq DNA polimerasa) 100u/ml y azida sódica al 0,05% como conservante.
- Tiras reactivas que contienen sondas de oligonucleótidos con las secuencias específicas de los alelos HLA-C fijadas en una membrana de nylon.
- Solución de 6,0 mM MgCl₂ con ProClin® 300 al 1% como conservante.
- Solución de desnaturalización con EDTA al 3%, hidróxido de sodio al 1,6% y azul de timol.

- Solución de fosfato sódico con NaCl, EDTA y ProClin® 150 al 1,0% como conservante (concentrado SSPE).
- Solución de dodecil sulfato sódico al 20% con ProClin® 150 al 1,0% como conservante (concentrado SDS).
- Conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) en una solución ACES con NaCl y ProClin® 150 al 1,0% como conservante.
- Solución de citrato con un 0,01% de H₂O₂ y 0,1% de ProClin® 150 al 1,0% como conservante (sustrato A).
- Solución de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) al 0,1% en dimetilformamida (DMF) al 40% (sustrato B).
- Solución de citrato de sodio.

La técnica para la realización del tipado de HLA-C por PCR-SSO reversa consiste en los siguientes pasos:

9.2.1. Reacción de amplificación

Se preparó una mezcla de los componentes para la PCR en cantidad suficiente para el número total de muestras a analizar, multiplicando el volumen de cada componente de la mezcla por el número de muestras a analizar más un exceso de dos. A cada tubo de PCR se le añadió la mezcla de reactivos más el ADN a estudio, en las cantidades reseñadas en la tabla 24.

Tabla 24. Volumen de los reactivos utilizados en la amplificación por PCR.

Componentes en la PCR	Solución 6,0 mM MgCl ₂	Mezcla principal	ADN
Volumen	15 µL	30 µL	15 µL

El ADN utilizado fue el extraído según se indica en el apartado 6, obteniendo una concentración entre 90-150 µg/ml.

Las muestras una vez preparadas se introdujeron en un termociclador 9600 Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, EE.UU.) o Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) donde se llevó a cabo el proceso de amplificación con las condiciones descritas en la tabla 25.

El proceso de amplificación fue llevado a cabo de la siguiente manera: la mezcla de reactivos para PCR que contiene la muestra de ADN se calienta a 95°C, lo que separa el ADN de doble hélice y expone las secuencias complementarias a la de los cebadores. Al enfriarse la mezcla, los cebadores biotinilados se alinean con las secuencias que reconocen.

La Taq (polimerasa recombinante termoestable) extiende, en presencia de un exceso de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), los cebadores alineados a las secuencias complementarias hasta producir una secuencia de ADN biotinilado denominada amplicón.

Este proceso se repite durante 35 ciclos en cada uno de los cuales se duplica la cantidad de ADN con la secuencia buscada (Tabla 25).

Tabla 25. Condiciones de amplificación de los alelos del locus HLA-C

Temperatura	Tiempo	Paso	Ciclos
95°C	15 seg	1	35
60°C	45 seg	2	
72°C	15 seg	3	
72°C	5 min	1	1
4°C	-	1	1

9.2.2. Reacción de hibridación

El segundo paso es conseguir la desnaturalización química de los amplicones para obtener ADN de cadena simple. Para ello se añadieron 60µL de la solución de desnaturalización y se incubó durante, al menos, 10 minutos.

En una bandeja de 48 pocillos, se colocaron las tiras de tipificación de HLA-C con 60µL del amplicón desnaturalizado de cada muestra. La bandeja se colocó en un equipo DynalAutoRELI™ lo que permitió automatizar el proceso, que consistió en los pasos que se describen a continuación:

- Adición del tampón de hibridación e incubación durante 30 minutos a 50°C con agitación constante.
- Tras la incubación se aspira el tampón de hibridación.
- Lavado de las muestras con tampón de lavado dos veces
- Adición de la solución de conjugado de trabajo (tampón de lavado y estreptavidina) e incubación durante 15 minutos.
- Aspiración de la solución de conjugado de trabajo.
- Lavado de las muestras con tampón de lavado dos veces
- Adición del tampón de citrato e incubación durante 5 minutos.

- Aspiración del tampón de citrato.
- Lavado con agua desionizada dos veces.

9.2.3. Reacción de detección

Tras concluir el proceso de hibridación se revelaron las tiras con estreptavidina-peroxidasa y se observaron las bandas azules con distinta intensidad de color según la hibridación producida entre las sondas de oligonucleótidos de secuencia específica y el ADN a estudio.

La lectura de las tiras se realizó mediante un escáner y la interpretación de los resultados con el software Dynal RELI™ SSO.

El proceso descrito se esquematiza en la siguiente figura.

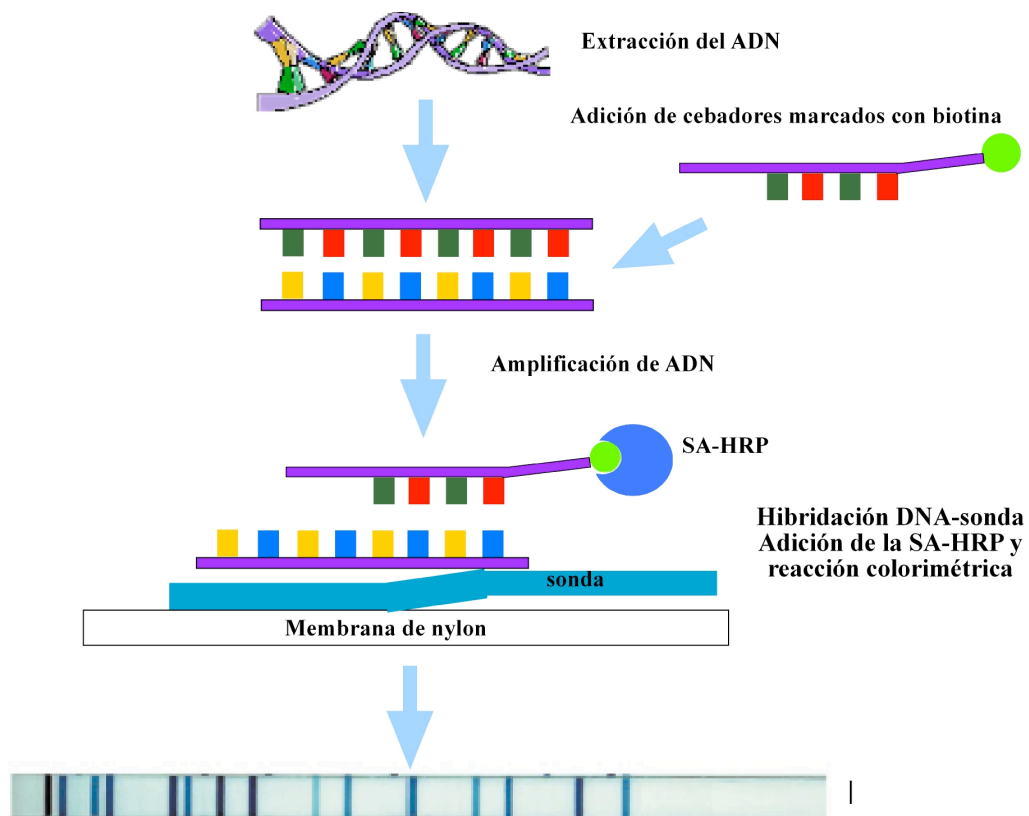


Figura 65. Esquema del tipaje de HLA-C mediante PCR-SSO reversa

9.3. Genotipado de HLA-B

Para la realización del genotipaje de HLA-B se utilizó la técnica de PCR-SSP. Para llevar a cabo la amplificación se tuvieron en cuenta las siguientes cantidades de D-mix, Taq ADN Polimerasa y ADN: 60µL de ADN de la muestra, 540µL de D-mix y 3µL de Taq DNA polimerasa.

Tras agitar la mezcla, se dispensaron 10µL en cada pocillo de la placa Micro SSPTM y se llevó a un termociclador 9600 Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, EE.UU.) o Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), donde se llevó a cabo el proceso de PCR. Las condiciones de amplificación se resumen en la tabla 26.

Tabla 26. Condiciones de amplificación de los alelos de los loci HLA-B

Temperatura	Tiempo	Paso	Ciclos
96°C	130 seg	1	1
63°C	60 seg	2	
96°C	10 seg	1	9
63°C	60 min	2	
96°C	10 seg	1	20
59°C	50 seg	2	
72°C	30 seg	3	
4°C	-	1	1

La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% para lo que se utilizaron 30ml de Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X, 0,75g de agarosa y bromuro de etidio.

10. Análisis estadístico

Los datos demográficos de los pacientes y los resultados del análisis de los genes KIR fueron recogidos en una base de datos (Microsoft Access 11.0; Microsoft corporation, Seattle, WA). El análisis estadístico fue realizado usando el SPSS 19.0 software (SPSS Inc., Chicago IL, USA). Para detectar diferencias en las frecuencias de los genes KIR, HLA y genotipos correspondientes, se utilizó el test X^2 -cuadrado y el test de Fisher de dos colas, que permitían comparar y categorizar variables entre grupos. En los casos en el que el análisis se realizó utilizando poblaciones con una muestra muy pequeña o con una evidente falta de normalidad se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Un análisis multivariable de regresión logística se aplicó también para confirmar asociaciones positivas, y se consideró estadísticamente significativo un nivel de $P < 0.05$. La Odds Ratio (OR) y su intervalo de confianza (CI al 95%) fueron calculados para estimar el riesgo relativo. Para determinar la supervivencia se aplicó el test de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA CIRROSIS HEPÁTICA EN LA POBLACIÓN DE PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE HEPÁTICO

El Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca presenta un largo recorrido en el área del trasplante hepático desde hace más de dos décadas, y de los pacientes sometidos a trasplante hepático en este centro. En este capítulo se analizaron las principales indicaciones a trasplante hepático, y más concretamente a la población de pacientes con cirrosis alcohólica.

1. Estudio de las principales indicaciones a trasplante hepático según el sexo del paciente

El objetivo de este capítulo ha sido conocer la demografía del total de pacientes sometidos a trasplante hepático. Para conocer la incidencia de la cirrosis hepática en el grupo de pacientes que fueron sometidos a trasplante hepático, se ha procedido a analizar esta indicación en el total de la serie de pacientes trasplantados entre 1988 hasta 2013. Igualmente se han analizado los mecanismos moleculares asociados a la cirrosis alcohólica, con la intención de que en el futuro se puedan realizar campañas para promover la moderación en el consumo de alcohol o intensificar las medidas ya existentes.

La Unidad de Trasplante Hepático de este hospital ha llevado a cabo desde 1988 hasta 2013 un total de 1026 trasplantes. Estos 1026 pacientes se han revisado retrospectivamente, y se ha podido verificar que el 73% correspondía a hombres (n=749) y el 27% a mujeres (n=277).

Tal como se resume en la tabla 27, de todas las indicaciones para trasplante hepático, la indicación más frecuente fue la cirrosis alcohólica (n=398; 38.4%), seguida de la cirrosis mediada por virus (n=247; 24.1%), hepatocarcinoma (n=104; 10.1%), hepatitis autoinmune (n =61; 5.9%) y hepatitis fulminante (n=39; 3,8%). El resto de

pacientes trasplantados lo fueron por otras indicaciones minoritarias y diversas (n=177; 17.3%).

Tabla 27. Principales indicaciones a trasplante hepático desde 1988 hasta 2013.

Principales indicaciones	Total N=1026 n (%)	Hombres N=749 (73) n (%)	Mujeres N=277 (27) n (%)	P	OR 95% IC
Cirrosis alcohólica^a	398 (38.4)	368 (50.3)	30 (11.5)	<0.001	7.952 (5.303-11.924)
Cirrosis por virus^b	247 (24.1)	156 (20.8)	91 (32.9)	<0.001	0.538 (0.396-0.731)
Hepatocarcinomas^c	104 (10.1)	79 (10.5)	25 (9.0)	0.560	1.189 (0.741-1.906)
Cirrosis Autoinmune	61 (5.9)	11 (1.5)	50 (18.1)	<0.001	0.068 (0.035-0.132)
Hepatitis Fulminante	39 (3.8)	14 (1.9)	25 (9.0)	<0.001	0.192 (0.098-0.375)
Otros	177 (17.3)	121 (16.2)	56 (20.2)	0.137	0.760 (0.535-1.081)

N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia de una patología concreta. ^a Se incluyó la cirrosis alcohólica total (con y sin virus). ^b Se han considerado las infecciones virales con indicación a trasplante, VHC, VHB, VHC+VHB, VHC+CMV y VHB+CMV, sin ninguna otra enfermedad asociada. ^c Hepatocarcinomas aislados sin asociar ninguna otra patología o indicación a trasplante. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P, expresa el valor de P obtenido al comparar la serie pacientes de sexo masculino y femenino para cada patología concreta. OR, Odds Ratio. IC, intervalo de confianza del 95%.

El grupo de otras patologías menos frecuentes mostrado en la tabla 26 (N=177) incluyó la cirrosis criptogenética, la amiloidosis, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la enfermedad de Wilson, los tumores de Klatskin, el síndrome de Budd-Chiari, la poliquistosis hepato-renal, la enfermedad de Caroli, el síndrome de Hellp y el retrasplante hepático.

En resumen, tal como se puede observar en la figura 66, el orden de indicaciones a trasplante hepático de mayor a menor frecuencia varía según el sexo. Así, en el grupo de hombres la cirrosis alcohólica resulta ser con diferencia la indicación de trasplante hepático de mayor incidencia en nuestro hospital (50.3%), seguida de la cirrosis por virus (20.8%) y el hepatocarcinoma (10.5%). Por el contrario, en el grupo de mujeres la indicación más frecuente para trasplante fue la infección vírica (32.9%) seguida de la patología autoinmune hepática (18.1%), pasando a un tercer lugar la cirrosis alcohólica (11.5%).

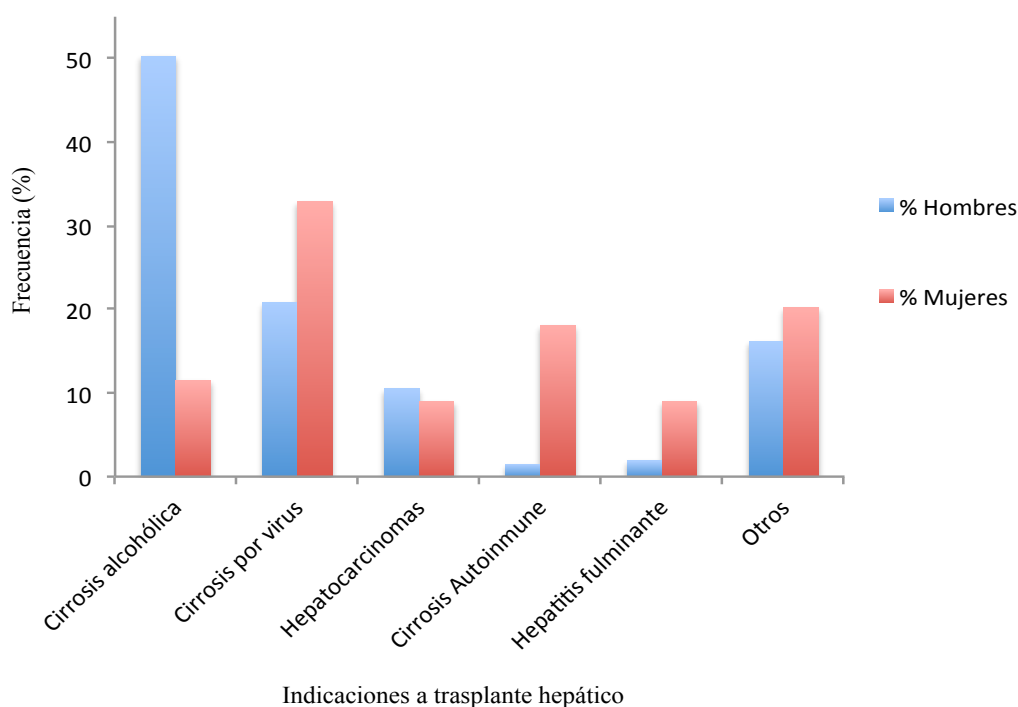


Figura 66. Frecuencias de indicaciones a trasplante hepático según sexo.

La mayor frecuencia de hombres es general en la mayoría de las indicaciones a trasplante. En la cirrosis alcohólica los hombres representaron un 50.3% frente al 11.5% de mujeres, diferencia que resultó altamente significativa ($P < 0.001$; OR=7.9, 95% IC=5.303-11.924), por lo que el riesgo de desarrollar cirrosis alcohólica es casi ocho veces más frecuente en los hombres que en las mujeres.

Por el contrario, la cirrosis por infección vírica representa un 20.8% en los hombres, y en las mujeres fue un 32.9% de todas las indicaciones a trasplante en ese grupo. Esta diferencia también es significativa ($OR=0.5$, 95% $IC=0.396-0.731$, $P<0.001$). Así pues, la probabilidad de presentar cirrosis por virus es menor en el caso de los hombres. Esto también se observa en el caso de la hepatitis autoinmune, ya que del total de 61 pacientes trasplantados con esa indicación, 50 fueron mujeres (18.1%) y 11 hombres (1.5%) diferencia que también fue estadísticamente significativa ($OR=0.068$, 95% $IC=0.035-0.132$, $P<0.001$).

En la hepatitis fulminante se observó una mayor frecuencia de mujeres (25 mujeres frente a 14 hombres; 9% vs 1.9%, respectivamente), diferencia que también resultó significativa ($OR=0.192$, 95% $IC=0.098-0.375$, $P<0.001$). Parece pues, que el sexo masculino está más protegido frente a la hepatitis autoinmune y la fulminante.

Las diferencias de frecuencia de las distintas indicaciones a trasplante hepático entre sexos fueron significativas para la mayoría de las patologías, excepto en el caso del hepatocarcinoma y de otras patologías ($P=0.560$ y $P=0.137$, respectivamente), aunque es posible que el resultado venga mediatizado porque estas causas son mucho más bajas.

En cuanto al grupo de cirrosis por virus sin otra patología asociada ($N=247$), se analizó los diferentes tipos de virus implicados o relacionados con el desarrollo de esta enfermedad. El virus más frecuente fue el VHC, que representó un 78.5% de este grupo, seguido por VHB que afectó al 16.5% de pacientes del grupo de cirrosis viral. La asociación de VHC y VHB se observó en un 3.2% de los casos, mientras que la de VHC y CMV se estuvo en dos casos (1.6%). Además, un 2% de pacientes con virus ($N=5$) no pudieron clasificarse en ninguno de los otros grupos establecidos. Estos resultados se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Frecuencia de infecciones virales no asociadas a ninguna otra enfermedad de base en los pacientes con trasplante hepático de HCUVA

	Total	Hombres	Mujeres
	N=247	N=156	N=91
	n (%)	n (%)	n (%)
VHC	190 (76.9)	115 (73.7)	75 (82.4)
VHB	40 (16.3)	27 (17.3)	13 (14.3)
VHC + VHB	8 (3.2)	8 (5.1)	0 (0)
VHC + CMV	4 (1.6)	2 (1.3)	2 (2.2)
VHB + CMV	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Otros*	5 (2)	4 (2.6)	1 (1.1)

N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia de una patología concreta. CMV; citomegalovirus, VHB; Virus de la hepatitis B virus, VHC; Virus de la hepatitis C. Se han considerado las infecciones con indicación a trasplante por VHC, VHB y VHC+VHB sin ninguna otra enfermedad asociada, teniendo en cuenta la presencia del CMV. *Incluye virus que causan patología hepática pero no se han podido determinar.

Al clasificar a estos pacientes afectados por virus según sexo, se observó como existe un mayor porcentaje de hombres (63.2%; N=156) que de mujeres (36.8%; N=91). En este grupo el VHC representó un 73.7% de las infecciones virales en hombres. Por el contrario, en las mujeres el VHC representó un mayor porcentaje (82.4%). Al analizar el VHB en hombres y mujeres se observó una distribución bastante similar en ambos grupos (17.3% vs 14.3%, respectivamente). La asociación de VHC con VHB sólo se observó en los hombres con un 8% de frecuencia (5.1%; N=8). Sin embargo, la presencia de VHC asociado a CMV se distribuyó de manera similar en hombres y mujeres (1.3% y 2.2%, respectivamente). No se observó ninguna asociación de VHB y

CMV. De los cinco pacientes sin clasificar, 4 de ellos son hombres (2.6%) y uno mujer (1.1%).

2. Influencia de la edad en la indicación del trasplante hepático

La edad media de los 1026 pacientes trasplantados fue analizada en el momento de la realización del trasplante, según se recoge en la tabla 29, y correspondió a 51.10 ± 0.38 (edad media $\pm$ EEM). Cabe remarcar que la edad no presentó diferencias significativas ambos sexos ($P=0.059$).

Posteriormente se analizó la edad media en pacientes según la indicación para trasplante, y este análisis reveló que los pacientes afectados por cirrosis alcohólica, cirrosis por virus y cirrosis autoinmune, presentaban una edad media similar a la del total de pacientes trasplantados, y que no existían diferencias significativas de edad entre ambos sexos. Por el contrario, la edad media de pacientes con hepatitis fulminante fue considerablemente menor que la del resto de pacientes (36.77 ± 2.72 años), y sin diferencias entre hombres y mujeres. En el caso de los CHC la edad media es algo mayor que la del resto de los grupos (54.61 ± 1.22 años).

Tabla 29. Edades medias del total de pacientes con indicación de trasplante hepático realizados en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca desde 1988 hasta 2013.

	Total N=1026	Hombres N=749	Mujeres N=277	
	Edad media ± EEM			P*
Total de pacientes trasplantados	51.10±0.38	51.60±0.40	49.75±0.89	0.059
Cirrosis alcohólica^a	53.02±0.43	53.06±0.45	52.47±1.33	0.675
Cirrosis por virus^b	52.36±0.70	51.70±0.73	53.49±1.43	0.266
Hepatocarcinomas^c	54.61±1.22	54.80±1.38	54.00±2.63	0.781
Cirrosis Autoimmune	53.11±1.65	52.45±3.82	53.26±1.85	0.853
Hepatitis Fulminantes	36.77±2.72	37.29±4.75	36.48±3.37	0.889
Otros	45.43±1.11	46.46±1.31	43.21±2.08	0.176

N, número total de individuos; EEM, error estándar de la media. Las comparaciones fueron hechas por el test T-Student. *P, valor obtenido al comparar a hombres y mujeres según la presencia de una enfermedad determinada. ^aSe incluyó la cirrosis alcohólica total (con y sin virus). ^bInfección por VHC/VHB asociados o no a CMV. ^cHepatocarcinomas no asociados a otras enfermedades o indicaciones para trasplante hepático.

3. Frecuencia de las distintas indicaciones a trasplante hepático a lo largo del periodo 1988-2013

El número de pacientes trasplantados hepáticos desde 1988 hasta 2013 ha ido variando a lo largo del tiempo, con un aumento progresivo hasta 2013 (último año incluido en este estudio), aunque con algunas oscilaciones. En la figura 67 puede

observarse como ha ido aumentando el número de pacientes trasplantados a partir de 1992 (N=34), alcanzando un número elevado de trasplantes en el año 2003, 2004 y 2006 (N=48 en los tres años). Se puede observar como en el año 2011 se registra el máximo pico de trasplantes con 62 pacientes trasplantados. En los dos años siguientes, el número registrados de trasplantes vuelve a descender hasta 42 pacientes en 2013.



Figura 67. En la gráfica se muestra el número de pacientes totales por año trasplantados desde 1988 hasta 2013 en HCUVA.

3.1. Evolución de la frecuencia de la cirrosis hepática alcohólica

Tal como se deduce de la figura 68 y la tabla 30 se puede observar que la frecuencia de cirrosis alcohólica, la indicación más frecuente de trasplante hepático, ha ido aumentando con el tiempo, alcanzando valores más altos en los últimos años (figura 68), de tal manera que ha pasado del mínimo registrado en 2001, con una frecuencia del 19.6%, a mostrar un aumento progresivo de frecuencia hasta el año 2009, donde observamos la mayor frecuencia de cirrosis alcohólica en nuestro hospital (57.4%), de modo que, comparando entre el año 2001 y 2009, las diferencias fueron significativas (OR=0.185, 95% IC: 0.075-0.460, $P<0.001$) (tabla 30). Sin embargo, a partir el 2009 (tabla 29), la tendencia se ha invertido cayendo su frecuencia en 2013 al 33.3%, (OR=2.696, 95% IC: 1.166-6.233, $P=0.024$).

3.2. Evolución de la frecuencia cirrosis hepática viral y de otras indicaciones menos frecuentes

La segunda causa más frecuente de indicación a trasplante hepático fue la cirrosis producida por virus. La incidencia de esta indicación, en contraste con la cirrosis alcohólica, se ha mantenido más estable, aunque con variaciones a lo largo de los años (figura 68C). Se observa un pico máximo en el año 2000, que representa una frecuencia de 45.5%, superior a la cirrosis alcohólica en ese mismo año (36.4%). En los años siguientes, la cirrosis por virus vuelve a quedar por debajo de la alcohólica. Además, se observa como en los últimos años existe una tendencia a la disminución de la cirrosis alcohólica y un incremento de la cirrosis por virus (figura 68C).

El hepatocarcinoma fue la tercera causa de indicación a trasplante hepático, con una frecuencia oscilante, entre el 26.7% en 1996, hasta el 2.3% en el año 2000 (figura 68D). Las cifras registradas en el último año (2013) son del 9.5% (tabla 30).

Tanto la cirrosis autoinmune como la hepatitis fulminante fueron indicaciones minoritarias como se refleja en la figura 68E y figura 68F, y excepto en los cuatro primeros años de mayor registro (1988-1991), donde llegaron a tener una frecuencia de hasta el 33.3% (año 1989), en los siguientes años ninguna de ellas supera el 10.3% de todas las indicaciones a trasplante. En el caso de la cirrosis autoinmune, la máxima frecuencia se observó en el año 2002 con un 10.3%, y en la hepatitis fulminante, en el año 1989 con una frecuencia del 33.3%, que posteriormente decayó a cifras más bajas (0-8.1%) (tabla 30).

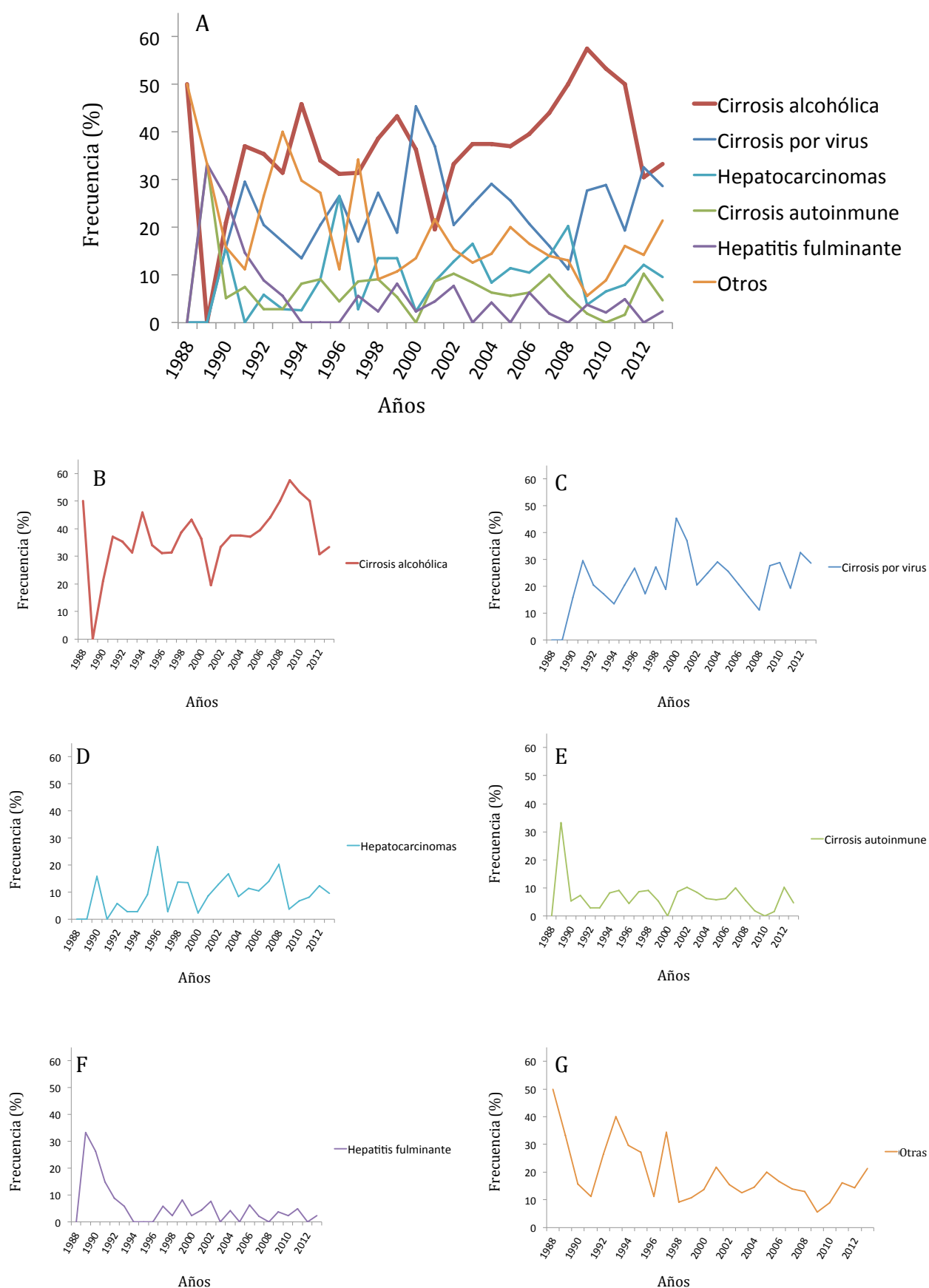


Figura 68. Frecuencia de cada una de las indicaciones a trasplante hepático según año, desde 1988 hasta 2013 en HCUVA. (A) Todas las indicaciones; (B) Cirrosis alcohólica; (C) Cirrosis por virus; (D) Hepatocarcinomas; (E) Cirrosis autoinmune; (F) Hepatitis fulminante; (G) Otras.

Tabla 30. Frecuencia de cada una de las patologías a las que se les realizó trasplante hepático desde 1988 hasta 2013 en HCUVA.

	Cirrosis alcohólica	Cirrosis por virus	Hepatocarcinoma	Cirrosis autoinmune	Hepatitis fulminante	Otras
	N=398	N=247	N=104	N=61	N=39	N=177
1988 N=2	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)
1989 N=3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)
1990 N=19	4 (21.1)	3 (15.8)	3 (15.8)	1 (5.3)	5 (26.3)	3 (15.8)
1991 N=27	10 (37)	8 (29.6)	0 (0)	2 (7.4)	4 (14.8)	3 (11.1)
1992 N=34	12 (35.3)	7 (20.6)	2 (5.9)	1 (2.9)	3 (8.8)	9 (26.5)
1993 N=35	11 (31.4)	6 (17.1)	1 (2.9)	1 (2.9)	2 (5.7)	14 (40)
1994 N=37	17 (45.9)	5 (13.5)	1 (2.7)	3 (8.1)	0 (0)	11 (29.7)
1995 N=44	15 (34.1)	9 (20.5)	4 (9.1)	4 (9.1)	0 (0)	12 (27.3)
1996 N=45	14 (31.1)	12 (26.7)	12 (26.7)	2 (4.4)	0 (0)	5 (11.1)
1997 N=35	11 (31.4)	6 (17.1)	1 (2.9)	3 (8.6)	2 (5.7)	12 (34.3)
1998 N=44	17 (38.6)	12 (27.3)	6 (13.6)	4 (9.1)	1 (2.3)	4 (9.1)
1999 N=37	16 (43.2)	7 (18.9)	5 (13.5)	2 (5.4)	3 (8.1)	4 (10.8)
2000 N=44	16 (36.4)	20 (45.5)	1 (2.3)	0 (0)	1 (2.3)	6 (13.6)
2001^{1,2} N=46	9 (19.6)	17 (37)	4 (8.7)	4 (8.7)	1 (2.2)	11 (23.9)
2002 N=39	13 (33.3)	8 (20.5)	5 (12.8)	4 (10.3)	3 (7.7)	6 (15.4)
2003 N=48	18 (37.5)	12 (25)	8 (16.7)	4 (8.3)	0 (0)	6 (12.5)
2004 N=48	18 (37.5)	14 (29.2)	4 (8.3)	3 (6.3)	2 (4.2)	7 (14.6)
2005 N=35	13 (37.1)	9 (25.7)	4 (11.4)	2 (5.7)	0 (0)	7 (20)
2006 N=48	19 (39.6)	10 (20.8)	5 (10.4)	3 (6.3)	3 (6.3)	8 (16.7)
2007 N=50	22 (44)	8 (16)	7 (14)	5 (10)	1 (2)	7 (14)

2008 N=54	27 (50)	6 (11.1)	11 (20.4)	3 (5.6)	0 (0)	7 (13)
2009 N=54	31 (57.4)	15 (27.8)	2 (3.7)	1 (1.9)	2 (3.7)	3 (5.6)
2010 N=45	24 (53.3)	13 (28.9)	3 (6.7)	0 (0)	1 (2.2)	4 (8.9)
2011 N=62	31 (50)	12 (19.4)	5 (8.1)	1 (1.6)	3 (4.8)	10 (16.1)
2012 N=49	15 (30.6)	16 (32.7)	6 (12.2)	5 (10.2)	0 (0)	7 (14.3)
2013³ N=42	14 (33.3)	12 (28.6)	4 (9.5)	2 (4.8)	1 (2.4)	9 (21.4)

N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia de una patología concreta. ¹ Valor de P obtenido al comparar a pacientes con cirrosis alcohólica en 2001 y 2009; ***P*<0.001**; OR=0.185, 95% IC: 0.075-0.460. ² Valor de P obtenido al comparar la frecuencia de los pacientes con cirrosis alcohólica trasplantados en 2001 y 2010; ***P*=0.002**; OR=0.219, 95% IC: 0.086-0.558. ³ Valor de P obtenido al comparar la frecuencia de los pacientes con cirrosis alcohólica trasplantados en 2013 y 2009; ***P*=0.024**; OR=2.696, 95% IC: 1.166-6.233.

3.3. Edad media de los pacientes con cirrosis hepática a los que se les realizó trasplante hepático (1988 a 2013)

En el caso de la cirrosis alcohólica, la edad media ha fluctuado a lo largo de los años, pero con una tendencia a aumentar progresivamente en el periodo estudiado, de manera que ha pasado de los 38 años en el año 1988, a los 57.1 en 2013 (tabla 31), siendo los años 2005, 2010 y 2011 los años donde la edad fue también alta, en torno a los 56 años.

Tabla 31. Edad media de los pacientes con cirrosis alcohólica a los que se les realizó trasplante hepático desde 1988 hasta 2013 en HCUVA.

Cirrosis alcohólica	
N=398	
	Edad Media $\pm$ EEM
1988	38 $\pm$ 5.03
1989	0
1990	43.3 $\pm$ 2.06
1991	42 $\pm$ 8.44
1992	47 $\pm$ 7.98
1993	49.2 $\pm$ 6.93
1994	49 $\pm$ 9.06
1995	47.8 $\pm$ 7.11
1996	52 $\pm$ 6.25
1997	55.2 $\pm$ 7.7
1998	52.3 $\pm$ 11.02
1999	51.3 $\pm$ 8.53
2000	53.7 $\pm$ 8.12
2001	52.8 $\pm$ 8.03
2002	50.2 $\pm$ 8.96
2003	52.8 $\pm$ 7.89
2004	54.4 $\pm$ 7.78
2005	56.8 $\pm$ 9.04
2006	52.4 $\pm$ 7.98
2007	53.8 $\pm$ 9.02
2008	55.5 $\pm$ 7.54
2009	55.8 $\pm$ 7.46
2010	56.6 $\pm$ 7.45
2011	56.4 $\pm$ 8.30
2012	53.5 $\pm$ 7.45
2013	57.1 $\pm$ 5.92
N, número total de individuos. EEM, error estándar de la media	

4. Serie de pacientes con cirrosis hepática alcohólica con indicación a trasplante hepático

La mayoría de los trasplantes hepáticos por cirrosis alcohólica realizados en el HCUVA corresponden a hombres (92,5%) mientras que el restante 7.5% se realizaron en mujeres. La edad media de los individuos sometidos a trasplante fue de 53.02 ± 0.43 años. Los hombres presentaron una edad media de 53.06 ± 0.45 , y las mujeres una edad media muy similar (52.47 ± 1.33), como se muestra en la tabla 32.

Tabla 32. Edad media y frecuencia según sexo de pacientes donde la cirrosis hepática alcohólica con indicación para trasplante hepático

	Total	Hombres	Mujeres
	N=398	N=368	N=30
Años $\pm$ EEM	53.02 ± 0.43	53.06 ± 0.45	52.47 ± 1.33
	n (%)	n (%)	n (%)
Con infección viral*	93 (23.4)	84 (22.8)	9 (30.0)
Sin infección viral	305 (76.6)	284 (77.2)	21 (70.0)

N, número total de individuos. n, número de individuos considerados en cada parámetro. *Se incluyen pacientes con infección viral por VHC, VHB, CMV, VHC+CMV y VHB+CMV. CMV; VHC; Virus de la hepatitis C, VHB; Virus de la hepatitis B virus citomegalovirus, EEM; Error estándar de la media.

Posteriormente se analizó la incidencia de infecciones en el total de pacientes con cirrosis alcohólica, observando que la mayoría de pacientes con cirrosis alcohólica cursaban sin infección viral asociada (76.6%), mientras que el resto presentaba algún tipo de infección viral asociada (23.4%). Estas tendencias se mantenían igualmente al comparar ambos sexos, de modo que, el 77.2% de hombres no presentaron infección viral asociada a cirrosis alcohólica, y en las mujeres se observó ausencia de infección viral en un 70% de los casos. En el grupo de cirrosis alcohólica con infección viral asociada un 22.8% fueron hombres y un 30% mujeres.

Al analizar el tipo de infección viral presente en el total de pacientes con cirrosis alcohólica, se observó que el virus de la hepatitis C era el más representado en esta población (64.5%). Su presencia fue similar tanto en hombres como en mujeres (tabla 32 y figura 69).

El segundo tipo de infección viral más frecuente fue el virus de la hepatitis B, con un porcentaje del 21.5%. Esta infección, al contrario que la del VHC, fue más frecuente en hombre que en mujeres (11.1% vs 2.6%). Además, se observó que el CMV representaba un 6.5% de las infecciones virales, y que era mucho más frecuente en mujeres que en hombres (22.2% vs 4.8%).

Cabe destacar que la presencia de doble infección viral por VHC y VHB en esta población fue muy baja, ya que se detectaron sólo cuatro de dichos pacientes (4.3%). Igualmente, infecciones asociadas a CMV, se detectaron sólo en dos para por VHC y CMV (2.2%), y un caso de VHB más CMV (1.1%). En el grupo de mujeres no se observó ningún caso de doble infección.

Tabla 32. Frecuencia de infecciones virales en pacientes donde la cirrosis alcohólica con indicación para trasplante hepático

	Total N=93	Hombres N=84	Mujeres N=9
	n (%)	n (%)	n (%)
VHC^{a, b, c}	60 (64.5)	54 (64.3)	6 (66.7)
VHB^{a, b, c}	20 (21.5)	19 (22.6)	1 (11.1)
CMV	6 (6.5)	4 (4.8)	2 (22.2)
VHC + VHB	4 (4.3)	4 (4.8)	0 (0.0)
VHC + CMV	2 (2.2)	2 (2.4)	0 (0.0)
VHB + CMV	1 (1.1)	1 (1.2)	0 (0.0)

N, número total de individuos. n, número de individuos considerados en cada parámetro. CMV; Citomegalovirus, VHB; Virus de la hepatitis B virus, VHC; Virus de la hepatitis C. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. ^a. Valor de P obtenido al comparar VHC con VHB en el total de pacientes con cirrosis alcohólica; OR=6.636; 95% IC: 3.458-12.738, **P<0.001**. ^b. Valor de P obtenido al comparar pacientes varones con VHC respecto pacientes varones con VHB; OR=6.158; 95% IC: 3.124-12.138, **P<0.001**. ^c. Valor de P obtenido al comparar mujeres con VHC y mujeres con VHB; P=0.050.

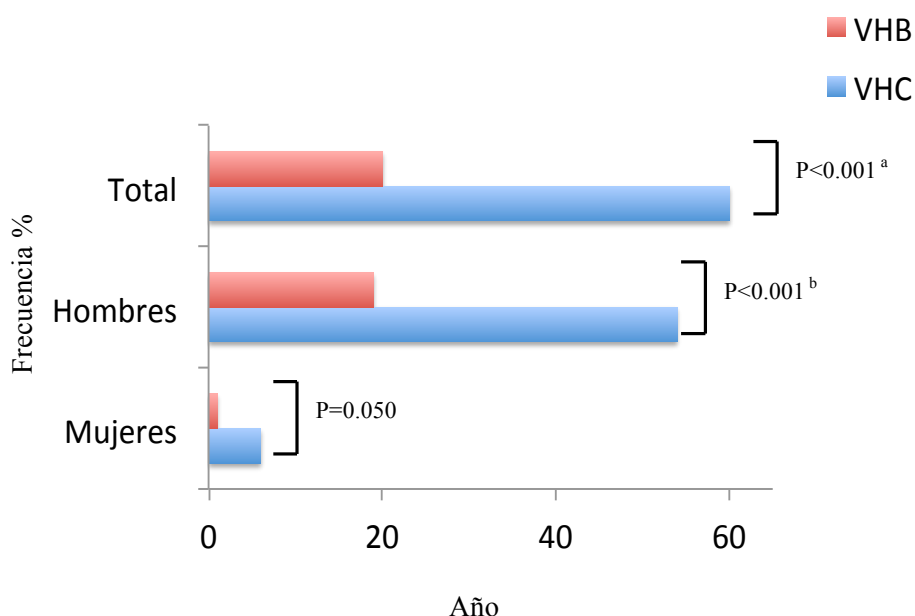


Figura 69. Frecuencia de infecciones virales por VHC y VHB en los pacientes trasplantados por cirrosis alcohólica en HCUVA. ^a. OR=6.636; 95% IC: 3.458-12.738, **P<0.001**; ^b. OR=6.158; 95% IC: 3.124-12.138, **P<0.001**.

5. Pacientes con infecciones virales

En este apartado se analizó a los pacientes con infecciones víricas totales, tanto asociadas o no a otras enfermedades. De los 1026 pacientes analizados, 396 correspondían a dicho grupo.

La causa vírica más frecuente de trasplante hepático fue la infección por el VHC (n=271; 68.4%), seguido por la de VHB, aunque con mucha menos representación (n=82; 20.7%). También se observaron infecciones virales por CMV (2.5%) del total de pacientes. En algunos casos, se detectaron también coinfecciones por VHC y VHB, en un total de 27 pacientes (6.8%), mientras que solamente cuatro pacientes presentaban infección por VHC más CMV. Finalmente también se han registrado dos casos de coinfección por VHB junto con CMV. (0.5%).

Tal como se recoge en la tabla 33, en todos los casos se observó un mayor porcentaje de hombres que de mujeres, excepto en las infecciones por VHC, donde un 71.9% de las mujeres presentaban VHC, y un 6.6% asociaban VHC y VHB.

Tabla 33. Frecuencia de infecciones virales en el total de pacientes trasplantados de hígado

	Total	Hombres	Mujeres	
	N=396	N=275	N=121	
	n (%)	n (%)	n (%)	P
VHC	271 (68.4)	184 (66.9)	87 (71.9)	0.349
VHB	82 (20.7)	62 (22.5)	20 (16.5)	0.182
CMV	10 (2.5)	6 (2.2)	4 (3.3)	0.502
VHC + VHB	27 (6.8)	19 (6.9)	8 (6.6)	1.000
VHC + CMV	4 (1.0)	3 (1.1)	1 (0.8)	1.000
VHB + CMV	2 (0.5)	1 (0.4)	1 (0.8)	0.518

N, número total de individuos. n, número de individuos considerados en cada parámetro. CMV; citomegalovirus, VHB; Virus de la hepatitis B virus, VHC; Virus de la hepatitis C. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P, valor de P obtenido al comparar a los pacientes hombres con mujeres.

5.1. Frecuencia de infecciones víricas asociadas a otras patologías con indicación a trasplante hepático

En la tabla 43 se recogen las infecciones víricas asociadas al resto de patologías que fueron causa de trasplante hepático en nuestro hospital. En el caso de la hepatitis autoinmune solo un paciente portaba virus VHB asociado.

En la hepatitis fulminante, 23 pacientes fueron por infección viral, de los cuales el 34.9% presentaba infección por VHB, y en el 47.8% se detectó coinfección por VHC y VHB. Por el contrario, el VHC sólo se detectó en un 4.3% de los casos. Dos casos de hepatitis fulminante fueron causadas por CMV (8.7%), y sólo en un caso el CMV se asoció a VHB (4.3%).

De los 104 casos de hepatocarcinomas, 37 asociaban infección viral. El VHC fue el virus que más frecuente en este grupo (54.1%), seguido por VHB (35.1%) y por VHC asociado a VHB en 4 casos (10.8%).

El grupo de virus sin otra patología asociada, tal como se comenta en el apartado 1 (tabla 28), está representado mayoritariamente por el VHC con un 76.9% de frecuencia, seguido del VHB con un 16.3%. La asociación de VHC con VHB pudo detectarse en un 3.2% de los casos. La infección por VHC más CMV se observa solamente en dos casos (1.6%). Además, existen 5 pacientes (2%) con virus que no se han podido clasificar por no poder determinarse qué tipo de virus presentaban (no vienen incluidos en la tabla 34).

Tabla 34. Frecuencia de infecciones virales asociadas a las principales indicaciones a trasplante hepático considerados en el HCUVA

	Hepatitis autoinmune	Hepatitis fulminante	Hepatocarcinomas	Virus
	N=1	N=23	N=37	N=247*
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
VHC	0 (0)	1 (4)	20 (54.1)	190 (78.5)
VHB	1 (100)	8 (34.9)	13 (35.1)	40 (16.5)
VHC + VHB	0 (0)	11 (47.8)	4 (10.8)	8 (3.2)
VHC + CMV	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (1.6)
VHB + CMV	0 (0)	1 (4.3)	0 (0)	0 (0)
CMV	0 (0)	2 (8.7)	0 (0)	0 (0)

N, número total de individuos. n, número de individuos considerados en cada parámetro. CMV; citomegalovirus, VHB; Virus de la hepatitis B virus, VHC; Virus de la hepatitis C. *En este grupo hay incluidos 5 pacientes (2%) con virus sin clasificación (ver tabla 28).

No se ha incluido el grupo de cirrosis alcohólica por estar analizado en el apartado 4 (Tabla 41).

5.2. Estudio de la frecuencia de infecciones víricas en toda la serie de estudio

Por otro lado, la frecuencia de trasplantes hepáticos por infecciones virales desde 1988 hasta 2013, aparece disminuida en los últimos años (figura 70), donde se observa que el VHC (línea roja) es el virus más frecuente en los pacientes sometidos a trasplante hepático, frecuencia que oscila entre el 20% y el 39%, manteniéndose más o menos estable en los últimos años.

La mayor frecuencia de individuos infectados con VHC corresponde a 44.4% en el año 1991. En los años siguientes frecuencia descendió hasta un 10.8% en el año 1994, pero de nuevo aumentó en el año 2000 (38.6%). Posteriormente la frecuencia de infección osciló entre el 29.2% y el 16.7%, con un pico en 2009 del 33.3%. En la actualidad la frecuencia de infección viral se mantiene reducida (26.2%; año 2013).

El VHB, la segunda causa más frecuente de trasplante hepático, presentó un pico máximo en 2002 (20.5%), aunque en general oscila entre el 2.7%-12.5%.

La infección por CMV tuvo una frecuencia baja, y parte de un 5.3% en 1990, para descender posteriormente por debajo del 3.7%.

En relación a la asociación de VHC y VHB la mayor incidencia corresponde a la etapa inicial, con un 21.1% en 1990, que descende a lo largo de los años. A partir de 2009 no hay más casos, excepto un 2% en 2012.

Las infecciones donde se asocia VHB o VHC con CMV, han sido muy escasas, y sólo en algún año se ha registrado una frecuencia de hasta el 2.9%.

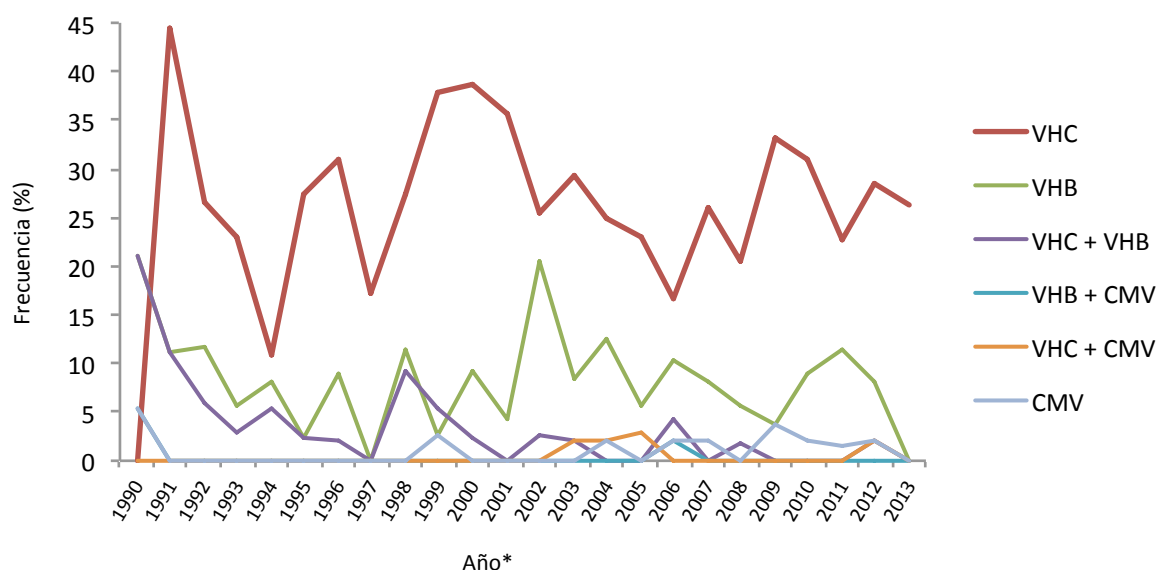


Figura 70. Frecuencia de infecciones virales según año desde 1988 hasta 2013. *Se ha omitido los dos primeros años por no haber ningún caso de trasplante por infección viral en 1988-1989.

6. Análisis de supervivencia en la serie total de pacientes

La supervivencia en el total de pacientes con trasplante hepático se analizó en un periodo de diez años desde el momento del trasplante. Así se pudo observar una supervivencia global del 74.4% al año, del 67.5% a los 3 años, del 64.1% a los 5 años y

del 61.7%. a los 10 años. En este análisis se comparó la supervivencia de cada una de las indicaciones a trasplante con respecto al resto de indicaciones (figura 71).

6.1. Supervivencia de pacientes trasplantados por cirrosis alcohólica

En la figura 71A se muestra la supervivencia a los diez años de los pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis alcohólica con respecto al resto de pacientes con otro tipo de indicaciones.

En este grupo la supervivencia fue del 81.2% al año, 74.6% a los 3 años, 71.9% a los 5 años, y 69.6% a los 10 años (línea roja vs línea azul). La supervivencia de la cirrosis alcohólica fue superior al resto de pacientes en su conjunto. Estas diferencias fueron significativas en todo el periodo de tiempo considerado, es decir, al año, 3, 5 y 10 años ($P<0.001$), en todos los casos. Por el contrario, al comparar la supervivencia de cada una de las patologías con la de los pacientes trasplantados por cirrosis alcohólica, se observa que los resultados solo son significativos a los tres años (Hepatocarcinoma vs cirrosis alcohólica: $P=0.012$; Virus vs cirrosis alcohólica: $P=<0.001$; Cirrosis autoinmune vs cirrosis alcohólica: $P=0.046$; Hepatitis fulminante vs cirrosis alcohólica: $P=0.036$; Otras vs cirrosis alcohólica: $P=<0.001$).

6.1.1. Supervivencia de los pacientes con cirrosis alcohólica infectados por virus

En un segundo análisis se evaluó la supervivencia del paciente cirrótico según presencia o ausencia de infecciones virales concomitantes. Se comparó la supervivencia de la cirrosis alcohólica entre pacientes afectados solo por cirrosis alcohólica sin infección viral ($n=305$), con la de aquellos pacientes que presentaban infección viral asociada ($n=93$), como se muestra en la figura 71B.

De este análisis se pudo deducir que la supervivencia durante los 10 años posteriores al trasplante fue siempre menor en el grupo de cirrosis alcohólica asociada a

virus. La comparación entre el grupo de cirrosis con infección viral y el de pacientes con cirrosis alcohólica sin virus, mostró diferencias durante todo el periodo analizado (1, 3, 5 y 10 años), aunque las mayores diferencias se observaron a corto plazo, a 1 y 3 años. De hecho, la supervivencia a 1 año en los pacientes sin infección, fue del 83.3%, y considerablemente menor en los que eran portadores de infección por virus (74.2%). Sin embargo, tras la comparación entre ambos grupos, las diferencias no alcanzaron significación estadística, y sólo se acercaron a la significación estadística cuando se compararon ambos grupos a 1 año, decreciendo claramente a medida que pasaba el tiempo ($P=0.052$ al año; $P=0.084$ a los 5 años; $P=0.124$ a los 10 años).

La supervivencia en el grupo sin virus se mantuvo a niveles más altos durante todo el periodo revisado, de manera que a los 10 años sobreviven un 71.1% de los pacientes no infectados, y un 64.5% de los infectados.

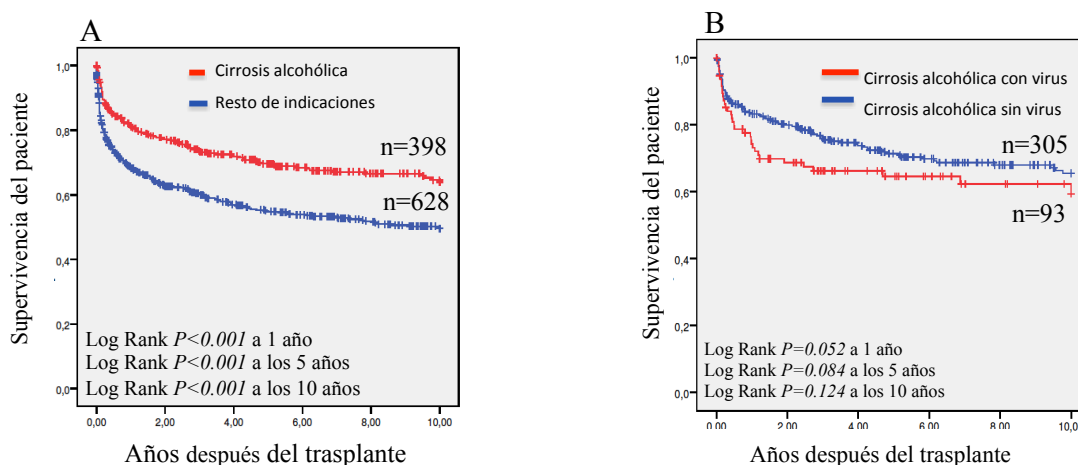


Figura 71. Supervivencia de los pacientes con trasplante hepático según patología.

6.2. Supervivencia de pacientes trasplantados por otras patologías

En este análisis de supervivencia se ha considerado la hepatitis autoinmune, la hepatitis fulminante y el hepatocarcinoma, pues el resto de patologías están muy poco representadas. Los resultados se muestran en la figura 72.

Los enfermos con hepatitis autoinmune mostraron unas tasas de supervivencia elevada (90.2% al año, 86.9% a los 3 años, 85.2% a los 5 años, y 80.3% a los 10 años), mayores que las del conjunto de indicaciones. Las diferencias en la supervivencia con respecto al resto de indicaciones fueron estadísticamente significativas ($P<0.001$) en todos los años analizados.

Además, al comparar la hepatitis autoinmune con cada una de las otras patologías, se observó que las diferencias en la supervivencia seguían siendo significativas al año en todos los casos, excepto para la cirrosis alcohólica.

Por el contrario, el análisis de supervivencia de pacientes con hepatitis fulminante no difería del conjunto otras patologías (69.2% al año, y 64.1% a los 5, 3 y 10 años), no siendo los resultados significativos en ningún periodo de tiempo establecido. Sin embargo, la comparación de la hepatitis fulminante con cada una de las otras patologías, reveló algunos resultados significativos (figura 72). Así, se observaron diferencias en la supervivencia al comparar con cirrosis alcohólica ($P=0.018$ al año y $P=0.036$ a los 3 años) y con hepatitis autoinmune ($P=0.005$ al año, $P=0.003$ a los 3 años, $P=0.006$ a los 5 años, y $P=0.027$ a los 10 años).

Con respecto al hepatocarcinoma, se observó una supervivencia algo menor que la del resto de patologías analizadas (75% al año, 61.5% a los 3 años, 52.9% a los 5 años, 50% a los 10 años), y en ningún caso con diferencias significativas. En cambio, cuando se comparó con cada una de las otras patologías, sí se encontraron diferencias significativas con respecto a la hepatitis alcohólica ($P=0.012$ a los 3 años; $P=0.031$ a los 5 años; $P<0.001$ a los 10 años) y la hepatitis autoinmune ($P=0.026$ al año; $P=0.001$ a los 3 años; $P<0.001$ a los 5 y 10 años).

En el grupo de los virus ($n=247$), la supervivencia total fue del 68.4% al año, del 60.3% a los 3 años, del 57.5% a los 5 años, y del 55.1% a los 10 años ($P<0.001$), menor

que el resto de patologías. Las diferencias fueron significativas cuando se comparó la supervivencia del grupo de virus con la cirrosis alcohólica, así como con la hepatitis autoinmune para todo el periodo de tiempo estudiado.

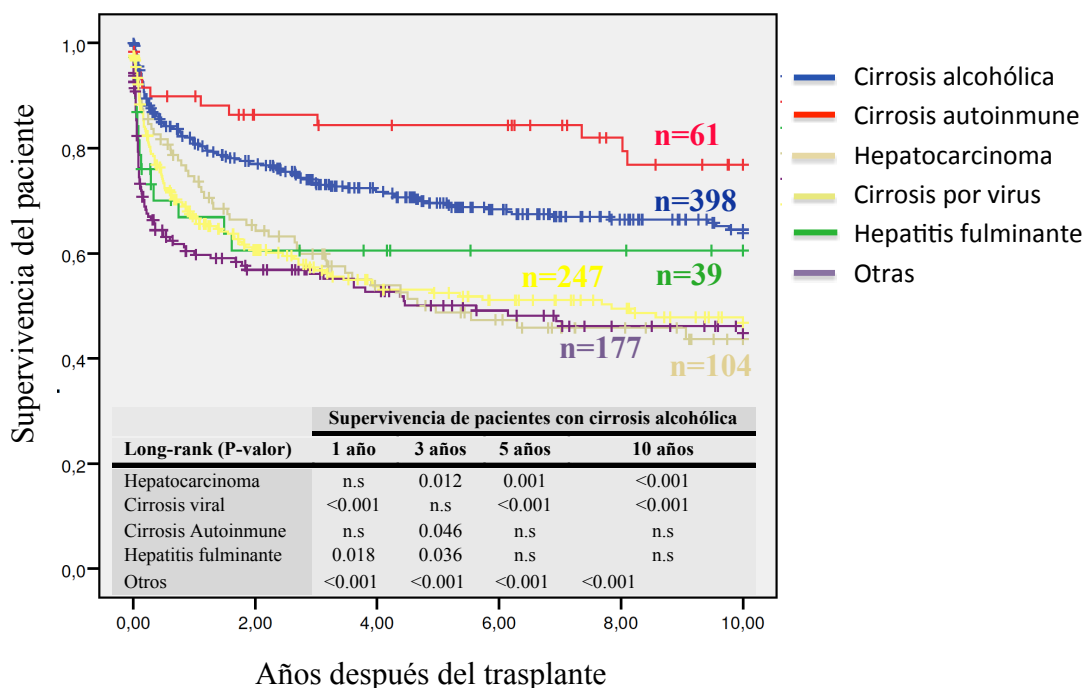


Figura 72. Supervivencia de los pacientes con trasplante hepático según cada una de las indicaciones a trasplante hepático.

6.3. Supervivencia de pacientes trasplantados por infecciones virales

A continuación se realizó un análisis de la supervivencia del paciente trasplantado en función del tipo de virus presente (n=396), resumido en la figura 73. En este análisis se compararon cada una de las distintas infecciones virales con las otras infecciones víricas, y también con pacientes que no presentaban ninguna infección viral (figura 73, línea azul).

Los pacientes trasplantados por VHC presentan una supervivencia significativamente menor que las otras infecciones virales a los 10 años (54.2%; $P=0.001$). Por el contrario, se observa que la supervivencia de los pacientes infectados

por VHB con respecto al resto de indicaciones a los 10 años, es mayor (65.9%) aunque las diferencias no resultan significativas.

Además, el estudio de los pacientes con infección por VHC y VHB concomitante, revela que la supervivencia a los 10 años es aún menor que la del resto de indicaciones (33.3%; $P<0.001$), y que la de sólo VHC ($P=0.008$) y VHB ($P=0.002$).

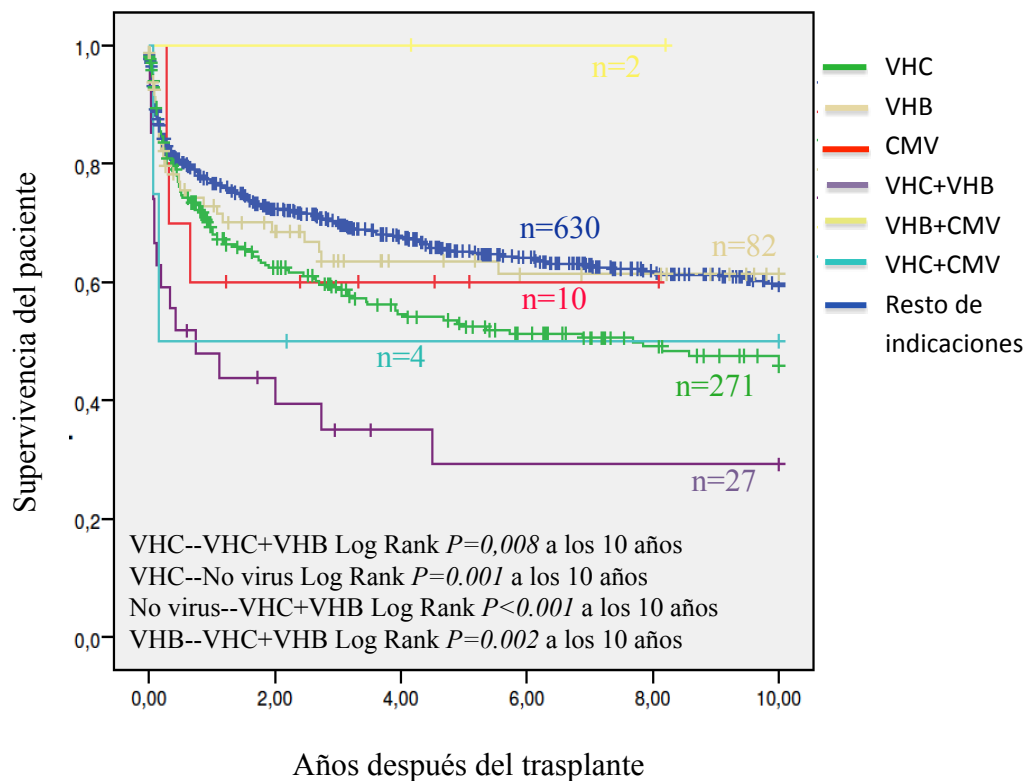


Figura 73. Supervivencia de los pacientes con trasplante hepático según tipo de virus.

CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA ALCOHÓLICA SOMETIDOS A TRASPLANTE HEPÁTICO Y DE GENES KIR/HLA

Este capítulo ha centrado en el estudio de pacientes varones sometidos a trasplante hepático, cuya indicación fue la cirrosis hepática alcohólica. En ellos se estudió su relación con los genes KIR/HLA y se compararon con individuos sanos con la finalidad de conocer la influencia en el desarrollo de cirrosis hepática alcohólica, y detectar aquellos pacientes susceptibles de medidas preventivas.

Una población total de 319 individuos varones sanos fue escogida como grupo control en este estudio.

La media de edad de este grupo de individuos fue de 51.71 ± 1.00 años, pero se utilizó la mediana de edad para establecer dos grupos distintos de edad: un grupo ≤ 54 años y otro grupo >54 años. El 52% (n=166) de los individuos sanos tenía una edad ≤ 54 años, mientras que los mayores de 54 años, representaban sólo un 48% (n=153).

1. Características demográficas y clínicas de pacientes varones con cirrosis alcohólica

Como se comenta en el Capítulo 1, de 1026 trasplantes hepáticos, el 38.4% (N=398) tuvieron como indicación a trasplante cirrosis alcohólica.

De los 398 pacientes con cirrosis alcohólica, solamente 22 pacientes correspondían a mujeres con una edad media de 52.47 ± 1.33 (media $\pm$ EEM), mientras que la mayoría fueron hombres con una edad media de 53.06 ± 0.45 años (media $\pm$ EEM).

Debido al escaso número de mujeres, éstas fueron excluidas del estudio, centrándonos en este capítulo II exclusivamente a la cohorte de hombres (n=281).

Una vez delimitado el sexo de los pacientes a estudiar, se igualaron en edad con los controles sanos varones, de tal manera que la población de pacientes varones con cirrosis alcohólica definitiva quedó reducida a 281 individuos, de tal manera que el grupo de pacientes-control era concordante en sexo y edad. Todos estos datos se resumen en la tabla 35.

Tabla 35. Datos demográficos de los pacientes con cirrosis alcohólica.

Parámetros		Pacientes con cirrosis alcohólica	
		Pacientes varones	Pacientes mujeres
		n (%)	n (%)
Edad media	Años $\pm$ EEM	53.63 $\pm$ 0.495	52.98 $\pm$ 0.46
N° de individuos	n (%)	281 (92.7)	22 (7.3)

N, número total de individuos; n, número de individuos en cada subgrupo.
EEM; error estándar de la media

A efectos de análisis, los pacientes con cirrosis alcohólica se clasificaron en dos grupos, de acuerdo a la presencia o ausencia de infección viral (n=68 y n=213, respectivamente).

1.1. Características demográficas y analíticas de los pacientes con cirrosis alcohólica

En la tabla 36, se ofrece un resumen de las características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en esta serie según la presencia o ausencia de infección viral.

Tabla 36. Datos demográficos y clínicos de los pacientes con cirrosis alcohólica

		Pacientes varones con cirrosis alcohólica		
		Pacientes		
		totales	Sin virus	Con virus*
		N=281	N=213	N=68
Variables demográficas		n (%)	n (%)	n (%)
Edad media	Años $\pm$ EEM	53.63 $\pm$ 0.495	55.14 $\pm$ 0.54	48.9 $\pm$ 0.94
Mediana de edad	$\leq$ 54 años	143 (50.9)	91 (42.7)	52 (76.5)¹
	>54 años	138 (49.1)	122 (57.3)	16 (23.5)
Variables clínicas	P/A			
IMC	Valor medio $\pm$ EEM	27.58 $\pm$ 0.50	27.72 $\pm$ 0.56	27.42 $\pm$ 1.15
	Peso normal ^a	27 (34.6)	17 (29.3)	10 (50.0)
	Sobrepeso ^b	51 (65.4)	41 (70.7)	10 (50.0)
Ascitis	+	162 (78.3)	119 (79.3)	43 (75.4)
	-	45 (21.7)	31 (20.7)	14 (24.6)
Grado de Ascitis	I	32 (20.6)	26 (22.4)	6 (15.4)
	II	67 (43.2)	44 (37.9)	23 (59.0)²
	III	56 (36.1)	46 (39.7)	10 (25.6)
Encefalopatía	+	91 (43.5)	72 (47.1)	19 (33.9)
	-	118 (56.5)	81 (52.9)	37 (66.1)
Grado de encefalopatía**	I	36 (41.9)	27 (39.1)	9 (52.9)
	II	40 (46.5)	33 (47.8)	7 (41.2)
	III	10 (11.6)	9 (13)	1 (5.9)

N, número total de individuos; n, número de individuos en cada subgrupo. P/A, presencia (+) o ausencia (-). ^a Peso normal; incluye individuos con un IMC de 18.5 a 25; ^b Sobrepeso; incluye individuos con un IMC mayor de 25. Índice de masa corporal; EEM: Error estándar de la media; INR; ratio internacional normalizado. El valor de P fue obtenido al comparar el grupo de pacientes sin infección viral y el de infección viral en individuos cirróticos. Las comparaciones fueron realizadas mediante el test exacto de Fisher de dos colas. ¹ Las comparaciones fueron realizadas comparando mediana de edad de pacientes $\leq$ 54 años sin virus con $\leq$ 54 años con virus; OR=0.230; 95% IC: 0.123-0.428, ***P*<0.0001**; ² Las comparaciones fueron realizadas comparando el grupo con ascitis grado II con el resto de grupos (ascitis grado I y III); OR=0.425; 95% IC: 0.203-891, ***P*=0.026**.

*Los pacientes con virus incluyen CMV, VHB y VHC, como se muestra en la tabla 39.

**No se ha incluido el grado IV en la tabla por no haber encontrado ningún paciente con ese estadio.

a) Edad media e infección viral

Del total de pacientes varones trasplantados por cirrosis alcohólica analizados, el 75.8% no presentó infección viral (n=213), mientras que un 24.2% estaban afectados por infecciones virales (n=68).

La media de edad del total de pacientes varones que desarrollan cirrosis alcohólica fue de 53.63 ± 0.495 años (media $\pm$ EEM), y no se encontraron diferencias significativas en la media de edad de pacientes y controles, ni entre paciente infectados o no infectados con virus.

Los pacientes totales se clasificaron en función de la mediana de edad en dos grupos, ≤ 54 años y > 54 años observando que en la cohorte total de pacientes (N=281) los pacientes estaban igualmente distribuidos en ambos grupos (50.9% vs 49.1%).

En el grupo de pacientes sin infecciones virales, el porcentaje de pacientes ≤ 54 años fue ligeramente inferior (42.7%; n=91) respecto al grupo de edad > 54 años (57.3%; n=122) no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos.

Por el contrario, cuando se analizó la frecuencia de pacientes con cirrosis alcohólica infectados por virus en ambos grupos de edades, el grupo ≤ 54 años estaba más representado (76.5%), existiendo un aumento estadísticamente significativo respecto al grupo de pacientes cirróticos sin infección viral asociada (OR=0.230; 95% CI: 0.123-0.428, $P < 0.0001$).

b) Índice de masa corporal

En este estudio también se calculó el **índice de masa corporal** (IMC) en función de la talla y del peso los días previos al trasplante hepático, lo que permitió clasificar a los pacientes en tres grupos según el valor de IMC (Tabla 36).

El IMC solo se pudo obtener en 78 pacientes de los 281 pacientes cirróticos, y su un valor medio fue 27.58 ± 0.50 años (media $\pm$ EEM) en el total de estos pacientes. Se

obtuvieron valores similares en los pacientes con infección viral (27.72 ± 0.56 años) y sin infección viral (27.42 ± 1.15 años). Por tanto, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de pacientes.

A continuación, se clasificaron a los pacientes en tres grupos en función del valor de IMC (N=78), de manera que los pacientes con un IMC inferior a 18.5 se consideraron pacientes con bajo peso, los que tenían un IMC entre 18.5 y 25 se consideraron pacientes con peso normal, y los que tenían un IMC superior a 25 se clasificaron como pacientes con sobrepeso.

Ningún paciente presentó un IMC inferior a 18.5, ya que la mayoría (65.4%) presentaban sobrepeso, y un 34.6% tenía un peso normal.

Por otro lado, un 29.3% de los pacientes sin infecciones virales mostraba un peso normal, mientras que los que tenían sobrepeso representaban un 70.7%. Sin embargo, el peso de los pacientes cirróticos con infecciones virales estaban repartidos de manera equitativa entre los diferentes grupos. Quizás esto se deba al limitado número de pacientes en este grupo (n=20).

c) Presencia de ascitis

La presencia o ausencia de **ascitis** se pudo examinar en un total de 207 pacientes, siendo más frecuente en los pacientes con cirrosis alcohólica (78.3%), mientras que un 21.7% de pacientes cirróticos no la presentaron. Resultados similares fueron observados en pacientes con y sin infección viral.

Cuando se estudió el grado de ascitis en el total de pacientes se observó como un 43.2% (n=67) presentaban una ascitis grado II, un 36.1% de los pacientes tenían un grado III y solamente un 20% tenían una ascitis de grado I. Como se observa en la tabla 36, esta distribución es igual en el grupo de pacientes con cirrosis alcohólica asociada a virus que en los pacientes sin virus, aunque la ascitis grado II fue más frecuente en el

grupo de cirróticos con infecciones virales que en los pacientes sin infección viral (59% vs 37.9%). En este caso las diferencias fueron estadísticamente significativas (OR=0.425; 95% IC: 0.203-891, $P=0.026$).

d) Presencia de encefalopatía

La presencia o ausencia de **encefalopatía** en los pacientes con cirrosis alcohólica, también fue analizada en este estudio en un total de 209 pacientes. Del total de éstos, el 43.5% (n=91) presentaba encefalopatía y un 56.5% (n=118) no la desarrollaron (Tabla 36). Frecuencias similares se obtuvieron tanto en el total de pacientes sin infección viral, donde el 47.1% presentaron encefalopatía hepática, frente a un 52.9% que no la desarrollaron. Por el contrario, el desarrollo de encefalopatía en pacientes cirróticos con infección viral fue menor, con un 33.9%, sin ser estas diferencias estadísticamente significativa ($P=0.115$).

Posteriormente se evaluó el grado de encefalopatía y se observó que el 41.9 % de los pacientes analizados presentaban encefalopatía grado I, un 46.5% (n=40) presentaban una encefalopatía de grado II y el restante 11.6% (n=10) tenían un grado III.

Cuando se analizó el grado de encefalopatía en los pacientes sin infección viral se observa que el 39.1% (n=27) presentaban encefalopatía grado I, mientras que un 47.8% (n=33) presentó grado II, y un 13% (n=9) correspondía a un grado III. Por el contrario, en la población de pacientes con infección viral la mayoría presentaban encefalopatía grado I (52.9%; n=9), el resto grado II y III (41.2%, n=7; y 5.9%, n=1, respectivamente). En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 36).

1.2. Factores bioquímicos en pacientes con cirrosis alcohólica

Se han estudiado un total de nueve parámetros bioquímicos en pacientes con cirrosis alcohólica (tabla 37).

La **creatinina** (mg/dl) se determinó en un total de 228 pacientes, y sus valores quedaron dentro del rango de normalidad, establecido como 0.7-1.2, con un valor medio de 1.08 ± 0.10 mg/dl. Valores similares fueron obtenidos en los pacientes con infección viral ($n=170$) y sin infección viral asociada ($n=58$).

La **albúmina** (g/dl) también fue considerada en un total de 174 pacientes, observándose que presentaba valores cercanos o menores que los establecidos para el límite inferior de la normalidad (3.46 ± 0.10 g/dl). En los pacientes con infección viral asociada ($n=125$) o sin infección viral ($n=49$), se observaron valores bastante similares.

El **bilirrubina total** (mg/dl) se determinó en 180 pacientes, y su valor medio fue de 3.17 ± 0.30 mg/dl. En pacientes sin infección viral asociada fue de 3.29 ± 0.41 mg/dl; $n=128$, y en los pacientes con infección viral algo inferiores, con valores de 2.80 ± 0.37 mg/dl; $n=52$, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

La **GOT** (transaminasa glutámico-oxalacética) se analizó en un total de 172 pacientes, observándose valores medios de 95.72 ± 13.34 U/l, algo superiores al límite superior de la normalidad. Al analizar su valor medio en pacientes con presencia o ausencia de virus asociado, se observó que las cifras de GOT eran más elevadas en el grupo de infección viral (108.40 ± 14.29 U/l; $n=50$), mientras que en los no infectados fue de (92.95 ± 19.54 U/l; $n=122$).

También se determinó la **GPT** (transaminasa glutámico-oxalacética) en un total de 174 pacientes, con valores medios de 71.92 ± 11.06 U/l, bastante similar a la de los

pacientes sin virus (70.94 ± 16.30 U/l; n=124), mientras que en los pacientes con virus asociado las cifras fueron más altas, con valores medios de 82.80 ± 10.93 U/l (n=50).

Otro parámetro bioquímico analizado fue la **FA** (fosfatasa alcalina), en 163 pacientes, y su valor medio fue de 173.60 ± 8.52 U/l. Al analizar a los pacientes según la presencia de virus, se observaron valores medios de 157.74 ± 9.29 U/l (n=116) en el grupo de pacientes sin virus, y 218.60 ± 19.86 U/l (n=47) en el de pacientes con virus. En este caso, la comparación ambos grupos mostró diferencias significativas ($P=0.007$).

El análisis de la **GGT** (gamma glutamil transpeptidasa) se realizó en 121 pacientes, y reflejó unos valores medios de 99.92 ± 6.78 U/l. Estos valores fueron algo más elevados en los pacientes con virus (122.61 ± 15.87 U/l; n=44), que en los pacientes sin virus asociado (95.73 ± 7.90 U/l; n=177), pero sin alcanzar diferencias significativas.

El **INR** (International normalized ratio) también se analizó en un total de 215 pacientes, con un valor medio ligeramente elevado de 1.44 ± 0.02 , respecto a los valores normales (0.9-1.2).

En función del valor de INR, se estableció tres grupos de acuerdo a los rangos de INR considerados para el cálculo del índice Child-Pugh. Cabe destacar que el 90.7% de los pacientes presentó valores inferiores a 1.8, un 7.4% presentó valores comprendidos entre 1.8-2.3, y un 1.9% presentó valores superiores a 2.3. Esta misma distribución fue observada en los pacientes sin y con infección viral.

Por último, se determinó la **actividad de protrombina** (%), ésta se analizó en 241 pacientes, obteniéndose valores medios de 58.93 ± 0.94 (media $\pm$ EEM), bastante más bajos que los valores normales (valores normales 70-100%). Resultados similares fueron obtenidos en los pacientes sin infección viral asociada (58.52 ± 2.00 %; N=165) y con infección viral asociada (58.91 ± 2.10 %; N=58).

Tabla 37. Parámetros bioquímicos de pacientes varones con cirrosis alcohólica previos al trasplante hepático

		Pacientes varones con cirrosis alcohólica		
Parámetros	Valores normales	Pacientes totales N=281	Sin virus N=213	Con virus* N=68
		n	n	n
		Media ± EEM	Media ± EEM	Media ± EEM
Creatinina (mg/dl)	0.7 – 1.2	228 1.08 ± 0.05	170 1.13 ± 0.06	58 1.00 ± 0.08
Albúmina (g/dl)	3.5 – 5.2	174 3.46 ± 0.05	125 3.51 ± 0.06	49 3.31 ± 0.09
Bilirrubina total (mg/dl)	0.05-1.2	180 3.17 ± 0.30	128 3.29 ± 0.41	52 2.80 ± 0.37
GOT (U/l)	5 – 40	172 95.72 ± 13.34	122 92.95 ± 19.54	50 108.40 ± 14.29
GPT (U/l)	5- 41	174 71.92 ± 11.06	124 70.94 ± 16.30	50 82.80 ± 10.93
FA (U/l)**	40 – 130	163 173.60 ± 8.52	116 157.74 ± 9.29	47 218.60 ± 19.86
GGT (U/l)	10 – 71	121 99.92 ± 6.78	177 95.73 ± 7.90	44 122.61 ± 15.87
INR	0.9-1.2	215 1.44 ± 0.02	165 1.45 ± 0.03	50 1.42 ± 0.05
<1.8 n (%)		195 (90.7)	149 (90.3)	46 (92.0)
1.8-2.3 n (%)		16 (7.4)	13 (7.9)	3 (6.0)
>2.3 n (%)		4 (1.9)	3 (1.8)	1 (2.0)
Actividad de protrombina (%)	70 – 100	241 58.93 ± 0.94	165 58.52 ± 2.00	58 58.91 ± 2.10

N, número total de individuos; n, número de individuos en cada subgrupo. GOT: transaminasa glutámico oxalacética; GPT: transaminasa glutámico pirúvica; FA: fosfatasa alcalina; GGT: gamma glutamil transferasa; INR: ratio internacional normalizado. Las comparaciones fueron hechas mediante el test de T-Student.

*Los pacientes con virus incluyen CMV, VHB y VHC, como se muestra en la tabla 39.

**Comparación de pacientes infectados por virus y no infectados, $P=0.007$.

1.3 Índices pronósticos clínicos de la cirrosis hepática alcohólica en pacientes no infectados e infectados por virus

Para establecer el pronóstico de los pacientes con cirrosis alcohólica se utilizaron dos índices: Child-Pugh y MELD (del inglés, *Model for End Stage Liver Disease*).

La clasificación de Child-Pugh también fue considerada en este estudio sobre un total de 144 pacientes (Tabla 38). La mayoría de los pacientes analizados, se clasificaron como Child-Pugh “B” con un 52.1% de representación (n=75), mientras que un 30.5% (n=44) presentaban un Child-Pugh “C”, y el restante 17.4% de los pacientes se clasificaron como Child-Pugh “A” (n=25). Esta distribución fue similar en ambos grupos (cirrosis con infección viral y cirrosis sin infección viral), no existiendo diferencias significativas.

Los valores de MELD, fueron calculados en un total de 163 pacientes (Tabla 38). La mayoría, tenían valores de MELD comprendidos entre 10-19 con un 70% de frecuencia (n=116), un 15.9 % tenían un MELD superior a 19 (n=26), y tan solo un 12.8% presentaron valores inferiores a 9 (n=21). Así como ocurría con el Child-Pugh, el MELD también se distribuyó de manera equitativa cuando los pacientes con cirrosis alcohólica se subdividían en cirrosis alcohólica sin virus y con virus. La media de puntuación MELD fue de 14.23 ± 0.37 .

Por ultimo, cabe destacar que el **grado de fibrosis hepática** global de grado F4 (según la escala METAVIR), puesto que todos los pacientes incluidos en lista de espera de trasplante hepático presentaban un cirrosis alcohólica establecida.

Tabla 38. Índices pronósticos de la cirrosis hepática en pacientes varones con cirrosis alcohólica en presencia o ausencia de infecciones virales

		Pacientes varones con cirrosis alcohólica		
Índice pronóstico	Clasificación	Pacientes	Sin virus	Con virus*
		totales	N=104	N=40
		N=144	N=104	N=40
		n (%)	n (%)	n (%)
Child-Pugh^a	A	25 (17.4)	17 (16.3)	8 (20.0)
	B	75 (52.1)	54 (51.9)	21 (52.5)
	C	44 (30.5)	33 (31.8)	11 (27.5)
		Pacientes	Sin virus	Con virus*
		totales	N=121	N=42
		N=163	N=121	N=42
		n (%)	n (%)	n (%)
MELD^b	<9	21 (12.9)	13 (10.7)	8 (19.0)
	10-19	116 (71.2)	90 (74.4)	26 (61.9)
	20-29	24 (14.7)	16 (13.2)	8 (19.1)
	30-39	2 (1.2)	2 (1.7)	0

N, número total de individuos; n, número de individuos en cada subgrupo. ^a Child-Pugh basado en cinco variables que incluyen niveles séricos de bilirrubina, albúmina, tiempo de protrombina o INR, ascitis y encefalopatía: Clase A: supervivencia al año 100%, a los 2 años del 85%; Clase B: supervivencia al año 80%, a los 2 años del 57%; Clase C: supervivencia al año 45%, a los 2 años del 35% (Child y Turcotte, 1964). ^b MELD se ha obtenido considerando la bilirrubina sérica, el INR y la creatinina sérica: >40, mortalidad a los tres meses 71.3%; 30-39, mortalidad a los tres meses 52.6%; 20-29, mortalidad a los tres meses 19.6%; 10-19, mortalidad a los tres meses 6%; <9, mortalidad a los tres meses 1.9% (Malinchoc y col., 2000). En nuestros pacientes media de puntuación MELD de 14.23 ± 0.37 .

* Los pacientes con virus incluyen CMV, VHB y VHC, como se muestra en la tabla 39.

1.4. Infecciones virales en la población de pacientes con cirrosis alcohólica

Para valorar la influencia de las infecciones virales en nuestra cohorte de pacientes con cirrosis alcohólica, se analizó el tipo de infección asociada en el total de 68 pacientes.

En la tabla 39 se muestra la frecuencia de la presencia de cada uno de los virus considerados en este estudio. Cabe destacar que de todas las infecciones virales asociadas a cirrosis alcohólica, la infección por VHC es la más representativa, con una frecuencia de 61.8%, que sumado a un porcentaje de coinfección por el VHB de 5.9% y de CMV de 2.9%, suponen un 70.6% de pacientes infectados por este virus.

El segundo tipo de infección más representada en esta población, corresponde al VHB con un 20.6% de frecuencia. Además, el VHB se presenta en un porcentaje muy pequeño asociado a CMV (2.9%, n=2). Finalmente tan solo un 5.9% de los pacientes infectados fueron infectados por CMV.

Tabla 39. Incidencia de las infecciones virales asociadas a pacientes varones con cirrosis alcohólica

Infecciones virales	N=68
	n (%)
VHC	42 (61.8)
VHB	14 (20.6)
CMV	4 (5.9)
VHC + VHB	4 (5.9)
VHC + CMV	2 (2.9)
VHB + CMV	2 (2.9)

N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia de cada tipo de virus. CMV: Citomegalovirus. VHB: Virus de la hepatitis B. VHC: Virus de la hepatitis C.

2. Genes KIR y cirrosis hepática alcohólica

En este estudio se analizó la frecuencia de la presencia o ausencia de cada uno de los genes KIR en un total de 319 controles sanos (N=319) y en el total de pacientes con cirrosis alcohólica (N=281), clasificando estos últimos según la presencia o ausencia de infecciones virales.

En el análisis de frecuencias de genes KIR se han excluido los genes constitutivos y los pseudogenes. Los primeros porque están presentes en todos los individuos y los segundos porque no codifican proteína y por tanto no contribuyen al repertorio de receptores NK. Para su interpretación y estudio, los genes KIR fueron clasificados según su función en inhibidores (iKIR) o activadores (aKIR).

2.1. Frecuencia de genes KIR inhibidores en pacientes con cirrosis alcohólica y controles

Tal y como se muestra en la tabla 40, en el análisis univariable no se detectaron diferencias significativas entre la frecuencia de genes iKIR de controles y pacientes, excepto para el gen KIR2DL2, cuya frecuencia era significativamente más baja en pacientes que en controles (63.3% vs 53.0%; OR=1.530; 95% IC: 1.103-2.120, $P=0.013$).

Tabla 40. Frecuencia de genes KIR en pacientes con cirrosis alcohólica y en controles varones sanos

Pacientes con cirrosis alcohólica varones									
KIR genes [*]	P/A	Controles sanos N=319	Pacientes totales N=281		Sin virus N=213	Con virus N=68	P2	P3	P4
		n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)			
iKIRs									
2DL1 (S1-)	+	197 (61.8)	160 (56.9)	0.244	115 (54.0)	45 (66.2)	0.088	0.581	0.092
	-	122 (38.2)	121 (43.1)		98 (46.0)	23 (33.8)			
2DL2	+	202 (63.3)	149 (53.0)	0.013 ^a	112 (52.6)	37 (54.4)	0.015 ^d	0.173	0.889
	-	117 (36.7)	132 (47)		101 (47.4)	31 (45.6)			
2DL3	+	279 (87.5)	249 (88.6)	0.707	190 (89.2)	59 (86.8)	0.586	0.842	0.661
	-	40 (12.5)	32 (11.4)		23 (10.8)	9 (13.2)			
3DL1	+	304 (95.3)	268 (95.4)	1.000	201 (94.4)	67 (98.5)	0.689	0.325	0.200
	-	15 (4.7)	13 (4.6)		12 (5.6)	1 (1.5)			
2DL5	+	170 (53.3)	158 (56.2)	0.511	121 (56.8)	37 (54.4)	0.477	0.894	0.780
	-	149 (46.7)	123 (43.8)		92 (43.2)	31 (45.6)			
aKIRs									
2DS1 (L1+)	+	119 (37.3)	119 (42.3)	0.211	96 (45.1)	23 (33.8)	0.087	0.678	0.121
	-	200 (62.7)	162 (57.7)		117 (54.9)	45 (66.2)			
2DS2 (L2+)	+	201 (63.0)	146 (52.0)	0.006 ^b	109 (51.2)	37 (54.4)	0.007 ^c	0.217	0.677
	-	118 (37.0)	135 (48)		104 (48.8)	31 (45.6)			
2DS3	+	107 (33.5)	93 (33.1)	0.931	65 (30.5)	28 (41.2)	0.508	0.263	0.107
	-	212 (66.5)	188 (66.9)		148 (69.5)	40 (58.8)			
2DS4	+	305 (95.6)	266 (94.7)	0.704	199 (93.4)	67 (98.5)	0.323	0.486	0.128
	-	14 (4.4)	15 (5.3)		14 (6.6)	1 (1.5)			
2DS5	+	86 (27.0)	99 (35.2)	0.033 ^c	85 (39.9)	14 (20.6)	0.002 ^f	0.360	0.004 ^g
	-	233 (73.0)	182 (64.8)		128 (60.1)	54 (79.4)			
3DS1	+	129 (40.4)	132 (47.0)	0.117	105 (49.3)	27 (39.7)	0.050	1.000	0.209
	-	190 (59.6)	149 (53.0)		108 (50.7)	41 (60.3)			

P, presencia; A, ausencia; N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus. ^a OR= 1.530; 95% IC:1.103-2.120 , $P=0.013$. ^b OR=1.575; 95% IC: 1.137-2.183, $P=0.006$. ^c OR=0.679; 95% IC: 0.479-0.961, $P=0.033$. ^d OR=1.557; 95% IC: 1.095-2.215, $P=0.015$. ^e OR=1.625; 95% IC: 1.143-2.311, $P=0.007$. ^f OR=0.556; 95% IC:0.384-0.804, $P=0.002$. ^g OR=2.561; 95% IC:1.339-4.900 , $P=0.004$.

* Genes constitutivos y pseudogenes no están incluidos.

En vista de estos resultados se aplicó un segundo análisis para evaluar la influencia de la homocigosis y heterocigosis del gen KIR2DL2 y si había diferencias entre pacientes e individuos sanos. Los resultados de este análisis se recogen en la tabla 41.

Este análisis implicó la estratificación de individuos en homocigotos y heterocigotos para KIR2DL2. Los individuos homocigotos para KIR2DL2 (KIR2DL2+/KIR2DL3-) estaban distribuidos de manera similar en controles y pacientes (12.3% y 11.4%, respectivamente). Igualmente, los datos obtenidos en el grupo de cirrosis alcohólica no asociada a infección viral (10.8%) y en el que asociaba infección viral (13.2%), no mostraron diferencias entre sí ($P=0.661$).

Cuando se consideraron individuos heterocigotos KIR2DL2+/KIR2DL3+, en el grupo control representaron un 51.3%, mientras que en los pacientes estaban disminuídos hasta un 41.6%. La comparación de ambos grupos en este caso si reveló diferencias estadísticamente significativas (OR=1.474; 95% IC: 1.067-2.037, $P=0.022$), diferencias que también aparecieron al comparar el grupo de pacientes sin infección viral y los controles sanos (41.8% vs 51.3%; OR=1.465; 95% IC: 1.032-2.079, $P=0.034$).

Tabla 41. Frecuencia de los genes KIR2DL2/L3 en pacientes con cirrosis alcohólica y en controles

		Pacientes varones con cirrosis alcohólica							
		Controles sanos N=319	Pacientes totales N=281		Sin virus N=213		Con virus N=68		
KIR genes	P/A	n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
KIR2DL2 homocigoto	+	39 (12.3)	32 (11.4)	0.801	23 (10.8)	9 (13.2)	0.680	0.840	0.661
	-	279 (87.7)	249 (88.6)		190 (89.2)	59 (86.8)			
KIR2DL2+/L3+ heterocigoto	+	163 (51.3)	117 (41.6)	0.022^b	89 (41.8)	28 (41.2)	0.034^d	0.143	1.000
	-	155 (48.7)	164 (58.4)		124 (58.2)	40 (58.8)			
KIR 2DL3 homocigoto	+	116 (36.5)	132 (47.0)	0.010^a	101 (47.4)	31 (45.6)	0.015^c	0.171	0.889
	-	202 (63.5)	149 (53.0)		112 (52.6)	37 (54.4)			

P, presencia; A, ausencia; N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas usando el test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus. ^a OR=0.648; 95% IC: 0.467-0.899, $P=0.010$. ^b OR=1.474; 95% IC: 1.067-2.037, $P=0.022$. ^c OR=0.637; 95% IC: 0.447-0.906, $P=0.015$. ^d OR=1.465; 95% IC: 1.032-2.079, $P=0.034$.

* Genes constitutivos y pseudogenes no están incluidos.

En contraste, como muestra la figura 74, la frecuencia de pacientes homocigotos para KIR2DL3 (KIR2DL2-/KIR2DL3+) fue mayor en el total de pacientes con cirrosis alcohólica que en los controles sanos (36.5% vs 47.0%), una diferencia que resultó estadísticamente significativa (OR=0.648; 95% IC: 0.467-0.899, $P=0.010$). Nuevamente, al considerar la cirrosis asociada o no a infección viral, solo se obtuvieron diferencias significativas al comparar los pacientes pertenecientes al grupo sin infección y el grupo control (OR=0.637; 95% CI: 0.447-0.906, $P=0.015$).

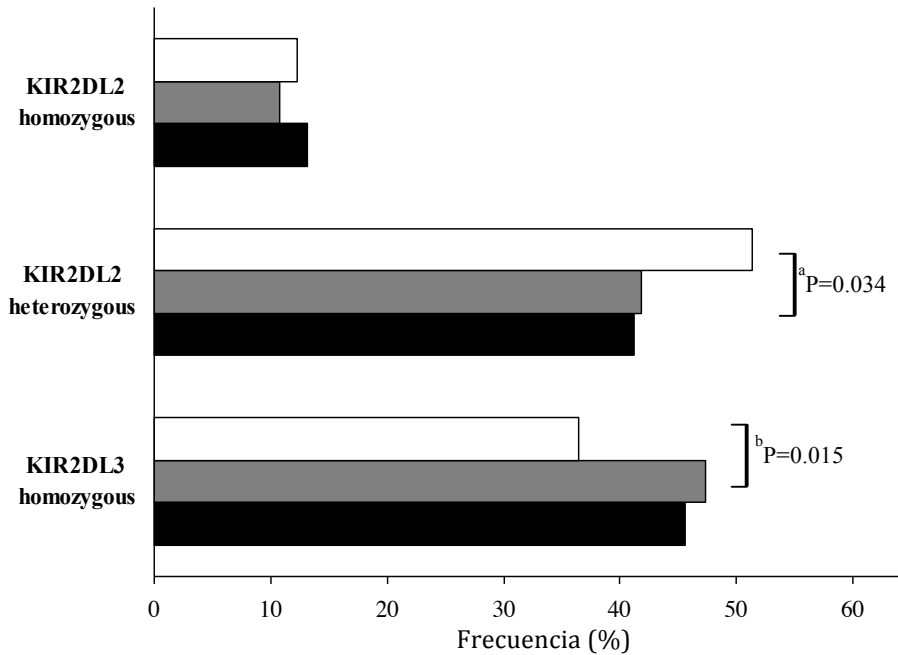


Figura 74. Frecuencias de genes KIR inhibidores centroméricos KIR2DL2/L3 en individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica con y sin infección viral asociada. Los individuos homocigotos para KIR2DL2 se distribuyeron de manera similar en ambos grupos de pacientes. Por el contrario, los heterocigotos para KIR2DL2 eran menos frecuentes en el grupo de pacientes, siendo estos datos significativos al comparar controles con pacientes con cirrosis alcohólica no viral ($P=0.034$). KIR2DL3 en homocigosis se encontraba altamente representado en el grupo de pacientes respecto a los controles, siendo esta diferencia significativa al comparar el grupo de cirrosis alcohólica no viral y los controles sanos ($P=0.015$). Controles sanos: barra blanca. Pacientes con cirrosis alcohólica no vira: barra gris. Pacientes con cirrosis alcohólica con virus: barra negra. ^a OR=1.465; 95% IC: 1.032-2.079, $P=0.034$. ^b OR=1.557; 95% IC: 1.095-2.215, $P=0.015$.

2.2. Frecuencias de genes KIR activadores en pacientes con cirrosis alcohólica y controles

En la tabla 40 se analizaron un total de seis genes KIR activadores. Se observó como la frecuencia de distribución del gen KIR2DS1 fue similar entre el grupo de pacientes y controles sanos (37.3% y 42.3%, respectivamente). Aunque este gen apareció aumentado en el grupo de pacientes sin infección viral (45.1%), dicho aumento no alcanzó diferencias estadísticamente significativas.

Cuando se analizó el gen KIR2DS2 (tabla 40), los resultados fueron similares a los obtenidos para el gen inhibidor KIR2DL2, algo lógico, ya que KIR2DS2 se encuentra altamente asociado a KIR2DL2 en nuestra población (figura 36) (Gourraud y col., 2010). Por esta razón, se analizó también la frecuencia conjunta de ambos genes observando que el conjunto de esos genes en el total de pacientes con cirrosis alcohólica estaba significativamente reducida con respecto a los controles (OR: 1.575; 95% IC:1.137-2.183, $P=0.006$). Observaciones similares se obtuvieron al comparar las frecuencias entre pacientes con cirrosis alcohólica no viral (51.2%) y en la población control (63%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (OR: 1.625; 95% IC: 1.143-2.311, $P=0.007$) (tabla 40). La frecuencia de ambos genes en la población de pacientes con infección viral también era más reducida que en el grupo control (54.4%), pero en este caso no alcanzó la significación estadística.

Las frecuencias de los genes activadores KIR2DS3 y KIR2DS4 también se analizaron en la población sana y enferma, donde su distribución fue similar, y por tanto, sin diferencias significativas.

En contraste, los genes KIR2DS5 y KIR3DS1 aparecieron sobrerrepresentados en pacientes respecto a controles, pero estas diferencias solamente fueron significativas para el gen KIR2DS5 (OR=0.679; 95% IC: 0.479-0.961, $P=0.033$).

A la vista de estos resultados se procedió a realizar un segundo análisis (figura 75), en el que los pacientes se estratificaron de acuerdo a la presencia o ausencia de infecciones virales asociadas, y se comparó la frecuencia de KIR2DS5 en los dos grupos resultantes con la observada en el grupo control. Se observó un aumento en la frecuencia de KIR2DS5 en los pacientes con cirrosis alcohólica no viral (39.9%) respecto a la población control (27%), diferencia estadísticamente significativa (OR=0.556; 95% IC: 0.384-0.804, $P=0.002$) (tabla 40; figura 75). Sin embargo se

observó una disminución de la frecuencia de KIR2DS5 en pacientes con infección viral (20.6%) respecto a los pacientes sin virus (39.9%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (OR=2.561; 95% IC:1.339-4.900 , $P=0.004$).

Cuando se analizó la frecuencia del gen centromérico KIR2DS3 (tabla 40) no se observaron diferencias significativas entre pacientes y controles, mientras que los genes aKIR teloméricos (KIR2DS1, KIR2S5 y KIR3DS1) estaban aumentados en los pacientes. Así pues, mientras el incremento de KIR2DS1 en pacientes no alcanzó diferencias significativas, el de KIR2DS5 era estadísticamente significativo en pacientes respecto a controles (OR=0.556; 95% IC: 0.384-0.804, $P=0.002$). No obstante, su frecuencia disminuía en pacientes con infección viral respecto a controles, pero en este caso la diferencia no alcanzó significación estadística ($P=0.360$).

Por otra parte, cuando se analizó la frecuencia del gen activador KIR3DS1 (tabla 40; figura 75), también se observó una frecuencia alta en los pacientes que no presentaban infección viral con respecto a los controles sanos, estando esta diferencia al borde de la significación estadística ($P=0.050$). Por ello, al seleccionar pacientes sin infecciones virales portadoras tanto de KIR2DS5 y KIR3DS1 (figura 75), se observaron diferencias con respecto a los controles o con respecto a las cirrosis virales (OR=1.434; 95% IC: 1.057-1.946, $P=0.001$; OR=0.595; 95% IC: 0.432-0.819, $P=0.002$, respectivamente), sugiriendo que estos dos genes pueden actuar de manera sinérgica.

Finalmente, se analizó de manera conjunta la influencia de los tres genes KIR centroméricos (KIR2DS1, KIR2DS5, KIR3DS1), observándose que todos ellos presentan un comportamiento similar a como lo hace de manera individual KIR2DS5.

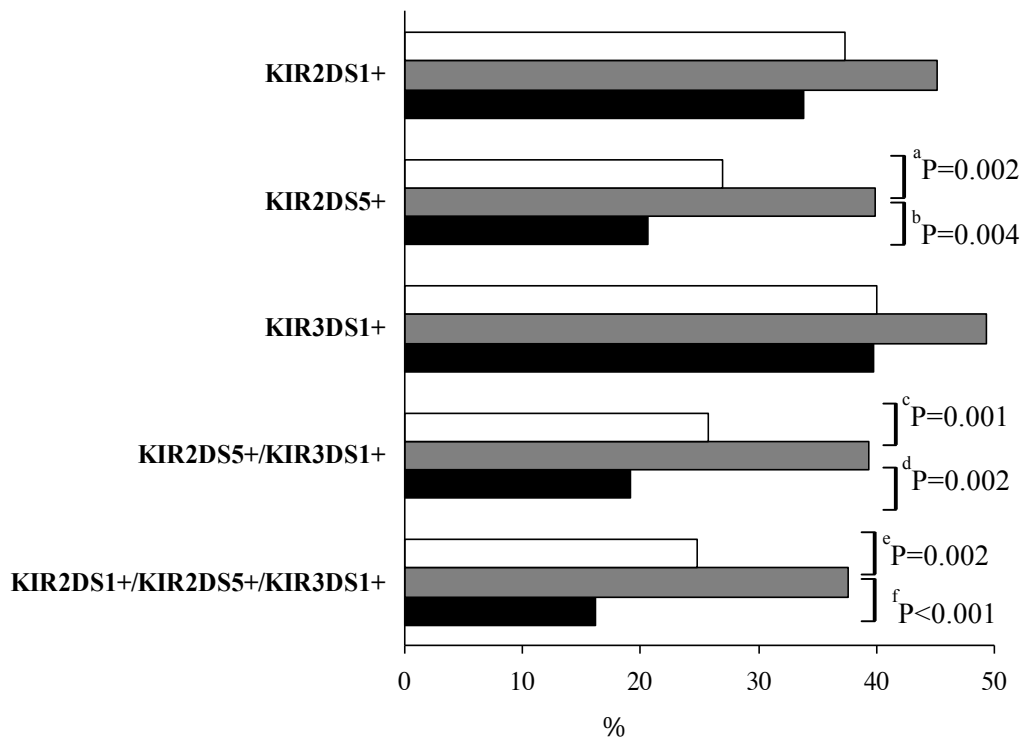


Figura 75. Frecuencia de los genes KIR inhibidores teloméricos en controles sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica con y sin infección viral asociada. Las barras blancas designan a la población control sana, las barras grises designan a los pacientes con cirrosis alcohólica sin infección viral, y las barras negras representan a los pacientes con cirrosis alcohólica con infección viral. KIR: Killer-cell immunoglobulin-like receptors. El valor de P fue determinado mediante el test exacto de Fisher de dos colas. ^a, OR=0.556; 95% IC: 0.384-0.804, $P=0.002$. ^b, OR=2.561; 95% IC: 1.339-4.900, $P=0.004$. ^c, OR=1.431; 95% IC: 1.057-1.946, $P=0.001$. ^d, OR=0.595; 95% IC: 0.432-0.819, $P=0.002$. ^e, OR=0.350; 95% IC: 0.181-0.674, $P=0.002$. ^f, OR=0.974; 95% IC: 0.505-0.987, $P<0.001$.

2.3. Relación entre la frecuencia de genes KIR en pacientes con cirrosis alcohólica y controles según grupos de edad

Una vez analizada la frecuencia de genes KIR en el total de controles y pacientes con y sin infección viral, se realizó un análisis teniendo en cuenta la edad.

Los diferentes grupos de edad se establecieron en función del valor de la mediana de edad (54 años), de tal manera que los pacientes quedaron incluidos en dos grupos, mayores de 54 años y menores de 54 años.

2.3.1. Pacientes del grupo de edad mayores de 54 años.

La aplicación del análisis univariable mostró que no existían diferencias significativas en la frecuencia de genes iKIR de pacientes y controles con edad superior a 54 años de manera similar a la observada en la población general. Sin embargo, el gen KIR2DL2, resultó estar significativamente más reducido en el grupo total de pacientes con cirrosis alcohólica que en el de individuos sanos (52.2% vs 66.7%, respectivamente, OR=1.833; 95% IC:1.141-2.945, $P=0.012$) (tabla 42). Cambios similares se observaron al comparar la frecuencia de KIR2DL2 en pacientes sin virus y el grupo control (50% vs 66.7%, respectivamente), pero sin que las diferencias resultaran significativas (OR=2.000; 95% IC: 1.227-3.261, $P=0.007$).

La frecuencia del gen KIR2DL1 presentó un aumento en el grupo del total pacientes respecto al de los controles (55.8% y 34.6%, respectivamente), pero esta diferencia no fue significativa. Algo similar sucede al considerar la presencia de infecciones virales para la frecuencia de KIR2DL1, de modo que en el grupo de pacientes con infección viral su frecuencia fue mayor (68.8%) que en el grupo sin infección (54.1%), pero sin diferencias significativas.

En cuanto a las frecuencias del resto de genes inhibidores KIR2DL3, KIR3DL1 y KIR2DL5 se observó una distribución similar en pacientes y controles, no observándose diferencias significativas.

El análisis de genes aKIR incluyó KIR2DS1 solo o asociado a KIR2DL1, puesto que KIR2DS1 se encuentra altamente asociado a KIR2DL1. El resultado de este análisis mostró una mayor frecuencia de KIR2DS1/L1 en pacientes que en controles (43.5% vs 34%, respectivamente) que no alcanzó significación estadística. La consideración de infecciones virales también demostró que la diferencia de frecuencia de este gen era

mayor en pacientes infectados que en controles. En ninguna de estas comparaciones, la diferencia con relación a controles, no llegó a ser estadísticamente significativa.

Como ya se ha referido, el gen KIR2DS2 se estudió junto con KIR2DL2 debido a la fuerte asociación entre ambos genes. Este gen presentó menor frecuencia en pacientes que en controles (66.7% vs 50%) diferencia que sí resultó significativa (OR=2.000; 95% IC: 1.245-3.212, $P=0.004$).

KIR2DS3 apreció menos representado en pacientes que en controles (34% vs 27.5%), pero sin diferencias significativas. Resultados similares se obtuvieron la analizar el grupo de pacientes sin virus (25.4%), no así en el grupo de pacientes con virus, en los que se observó una mayor frecuencia de este gen (43.8%) que en controles, pero esta diferencia tampoco fue significativa.

Por el contrario, la frecuencia de KIR2DS4 no presentó diferencias con el grupo control.

KIR2DS5 y KIR3DS1 tenían una mayor representación en pacientes que en el grupo control, con diferencias significativas solo en KIR2DS5 (26.8% vs 39.9%) (OR=0.552; 95% IC: 0.337-0.905, $P=0.024$). El análisis de los pacientes según presencia o ausencia de virus también reveló una mayor frecuencia de este gen en los pacientes sin virus (42.6%), diferencia que alcanzó significación estadística (OR=0.493; 95% IC: 0.297-0.818, $P=0.007$).

Tabla 42. Frecuencia de genes KIR en pacientes con cirrosis alcohólica y controles sanos varones mayores de 54 años.

		Pacientes con cirrosis alcohólica varones							
		Controles sanos N=153	Pacientes totales N=138		Sin virus N=122	Con virus N=16			
KIR genes *	P/A	n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
iKIRs									
2DL1 (S1-)	+	100 (34.6)	77 (55.8)	0.118	66 (54.1)	11 (68.8)	0.064	1.000	0.298
	-	53 (65.4)	61 (44.2)		56 (45.9)	5 (31.3)			
2DL2	+	102 (66.7)	72 (52.2)	0.012^a	61 (50)	11 (68.8)	0.007^d	1.000	0.190
	-	51 (33.3)	66 (47.8)		61 (50)	5 (31.3)			
2DL3	+	134 (87.6)	124 (89.9)	0.583	111 (91)	13 (81.3)	0.438	0.442	0.208
	-	19 (12.4)	14 (10.1)		11 (9)	3 (18.8)			
3DL1	+	144 (94.1)	131 (94.9)	0.802	115 (94.3)	16 (100)	1.000	1.000	1.000
	-	9 (5.9)	7 (5.1)		7 (5.7)	0 (0)			
2DL5	+	84 (54.9)	74 (53.6)	0.906	66 (54.1)	8 (50)	0.904	0.795	0.795
	-	69 (45.1)	64 (46.4)		56 (45.9)	8 (50)			
aKIRs									
2DS1 (L1+)	+	52 (34)	60 (43.5)	0.117	55 (45.1)	5 (31.3)	0.063	1.000	0.422
	-	101 (66)	78 (56.5)		67 (54.9)	11 (68.8)			
2DS2 (L2+)	+	102 (66.7)	69 (50)	0.004^b	58 (47.5)	11 (68.8)	0.002^c	1.000	0.182
	-	51 (33.3)	69 (50)		64 (52.5)	5 (31.3)			
2DS3	+	52 (34)	38 (27.5)	0.255	31 (25.4)	7 (43.8)	0.146	0.425	0.141
	-	101 (66)	100 (72.5)		91 (74.6)	9 (56.3)			
2DS4	+	144 (94.1)	131 (94.9)	1.000	115 (94.3)	16 (100)	1.000	1.000	1.000
	-	8 (5.2)	7 (5.1)		7 (5.7)	0 (0)			
2DS5	+	41 (26.8)	55 (39.9)	0.024^c	52 (42.6)	3 (18.8)	0.007^f	0.765	0.102
	-	112 (73.2)	83 (60.1)		70 (57.4)	13 (81.3)			
3DS1	+	59 (38.6)	65 (47.1)	0.155	60 (49.2)	5 (31.3)	0.087	0.787	0.196
	-	94 (61.4)	73 (52.9)		62 (50.8)	11 (68.8)			

P, presencia; A, ausencia; N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus. ^a OR=1.833; 95% IC:1.141-2.945, $P=0.012$. ^b OR=2.000; 95% IC:1.245-3.212, $P=0.004$. ^c OR=0.552; 95% IC:0.337-0.905, $P=0.024$. ^d OR=2.000; 95% IC:1.227-3.261, $P=0.007$. ^e OR=2.207; 95% IC:1.353-3.599, $P=0.002$. ^f OR=0.493; 95% IC:0.297-0.818, $P=0.007$.

* Genes constitutivos y pseudogenes no están incluidos.

2.3.1.1. Homocigosidad o heterocigosidad de KIR2DL2 y KIR2DL3 en pacientes con cirrosis alcohólica y controles sanos de edad superior a 54 años

En vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior referentes a KIR2DL2, se aplicó un análisis para evaluar si había diferencias en la frecuencia de KIR2DL2 o KIR2DL3 en homocigosis o heterocigosis, en pacientes e individuos sanos varones con edad mayor de 54 años. Tal y como se muestra en la tabla 43, los pacientes se estratificaron como homocigotos y heterocigotos para KIR2DL2 y se comparó la frecuencia en cada una de las poblaciones consideradas.

Tabla 43. Frecuencia de genes KIR2DL2 y KIR2DL3 en homocigosis y heterocigosis en pacientes con cirrosis alcohólica y controles sanos varones mayores de 54 años.

		Pacientes con cirrosis alcohólica							
		Controles sanos N=153	Pacientes totales N=138		Sin virus N=122		Con virus N=16		
KIR genes	P/A	n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
KIR2DL2 homocigoto	+	19 (12.4)	14 (10.1)	0.583	11 (9.0)	3 (18.8)	0.438	0.442	0.208
	-	134 (87.6)	124 (89.9)		111 (91.0)	13 (81.2)			
KIR2DL2+/L3+ heterocigoto	+	83 (54.2)	58 (42.0)	0.046^a	50 (41.0)	8 (50)	0.030^b	0.796	0.593
	-	70 (45.8)	80 (58.0)		72 (59.0)	8 (50)			
KIR2DL3 homocigoto	+	51 (33.3)	66 (47.8)	0.012^c	61 (50)	5 (31.3)	0.007^d	1.000	0.190
	-	102 (66.6)	72 (52.2)		61 (50)	11 (68.7)			

P, presencia; A, ausencia; N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus. ^a OR=1.635; 95% IC: 1.028-2.601, P=0.046. ^b OR=1.707; 95% IC: 1.055-2.762, P=0.030. ^c OR=0.545; 95% IC: 0.340-0.876, P=0.012. ^d OR=0.500; 95% IC: 0.307-0.815, P=0.007.

Los individuos homocigotos para KIR2DL2 (KIR2DL2+/KIR2DL3-) estaban distribuidos de manera similar en el grupo de controles y en el de pacientes. Sin embargo, su frecuencia en el grupo de pacientes con cirrosis asociada a virus, duplicaba la de los pacientes sin virus, pero el número de pacientes con virus fue muy reducido y ello quizás influyó en que la diferencia no alcanzara significación estadística.

En cambio, los individuos KIR2DL2 heterocigotos (KIR2DL2+/KIR2DL3+) eran significativamente menos frecuentes en el grupo total de pacientes que en controles (42.0% vs 54.2%, respectivamente). Además, cuando se comparaba el grupo de pacientes sin virus con controles sanos (OR=1.707; 95% IC: 1.055-2.762, $P=0.030$).

En contraste, la frecuencia de pacientes homocigotos para KIR2DL3 era mayor en el grupo total de pacientes con cirrosis alcohólica que en controles, un aumento que solo fue estadísticamente significativo cuando los pacientes pertenecientes al grupo sin infección viral asociada fueron comparados con los controles sanos (OR=0.500; 95% IC: 0.307-0.815, $P=0.007$).

2.3.2. Pacientes del grupo de edad menores o iguales a 54 años.

A diferencia de lo que ocurría en los pacientes de edad superior a 54 años, el análisis univariable (tabla 44) no mostró diferencias significativas en la frecuencia de genes iKIR y aKIR entre pacientes varones con cirrosis alcohólica con 54 años o menos ($n=143$) y en controles sanos ($n=166$). En la parte superior de la tabla 44 se recogen las frecuencias de los genes iKIR en las diferentes poblaciones estudiadas. En ningún caso las frecuencias de los genes KIR mostraron diferencias significativas. No obstante, KIR2DL2 era menos frecuente en los tres grupos de pacientes, especialmente en los infectados por virus, pero las diferencias fueron insignificantes para alcanzar significación estadística.

Tabla 44. Frecuencia de genes KIR en pacientes con cirrosis alcohólica y en controles sanos varones iguales o menores de 54 años.

		Pacientes con cirrosis alcohólica varones							
		Controles sanos N=166	Pacientes totales N=143		Sin virus N=91	Con virus N=52			
KIR genes *	P/A	n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
iKIRs									
2DL1 (S1-)	+	97 (58.4)	83 (58)	1.000	49 (53.8)	34 (65.4)	0.512	0.419	0.218
	-	69 (41.6)	60 (42)		42 (46.2)	18 (34.6)			
2DL2	+	100 (60.2)	77 (53.8)	0.299	51 (56.0)	26 (50.0)	0.596	0.202	0.492
	-	66 (39.8)	66 (46.2)		40 (44)	26 (50.0)			
2DL3	+	145 (87.3)	125 (87.4)	1.000	79 (86.8)	46 (88.5)	1.000	1.000	1.000
	-	21 (12.7)	18 (12.6)		12 (13.2)	6 (11.5)			
3DL1	+	160 (96.4)	137 (95.8)	1.000	86 (94.5)	51 (98.1)	0.527	1.000	0.417
	-	6 (3.6)	6 (4.2)		5 (5.5)	1 (1.9)			
2DL5	+	86 (51.8)	84 (58.7)	0.252	55 (60.4)	29 (55.8)	0.193	0.637	0.601
	-	80 (48.2)	59 (41.3)		36 (39.6)	23 (44.2)			
aKIRs									
2DS1 (L1+)	+	67 (40.4)	59 (41.3)	0.908	41 (45.1)	18 (34.6)	0.510	0.517	0.290
	-	99 (59.6)	84 (58.7)		50 (54.9)	34 (65.4)			
2DS2 (L2+)	+	99 (59.6)	77 (53.8)	0.357	51 (56.0)	26 (50.0)	0.598	0.261	0.492
	-	67 (40.4)	66 (46.2)		40 (44.0)	26 (50.0)			
2DS3	+	55 (33.1)	55 (38.5)	0.343	34 (37.4)	21 (40.4)	0.497	0.405	0.725
	-	111 (66.9)	88 (61.5)		57 (62.6)	31 (59.6)			
2DS4	+	160 (96.4)	135 (94.4)	0.425	84 (92.3)	51 (98.1)	0.232	1.000	0.258
	-	6 (3.6)	8 (5.6)		7 (7.7)	1 (1.9)			
2DS5	+	45 (27.1)	44 (30.8)	0.529	33 (36.3)	11 (21.2)	0.156	0.469	0.063
	-	121 (72.9)	99 (69.2)		58 (63.7)	41 (78.8)			
3DS1	+	70 (42.2)	67 (46.9)	0.423	45 (49.5)	22 (42.3)	0.295	1.000	0.487
	-	96 (57.8)	76 (53.1)		46 (50.5)	30 (57.7)			

P, presencia; A, ausencia; N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus.

* Genes constitutivos y pseudogenes no están incluidos.

Cuando se analiza el gen KIR2DL1 no se observan diferencias significativas entre la cohorte de pacientes y el grupo control. Sin embargo, se puede observar una disminución de la frecuencia de KIR2DL2+ en el total de pacientes con cirrosis alcohólica en comparación con el grupo control (60.2% vs 53.8%), pero no siendo en este grupo de pacientes estadísticamente significativa. Igualmente se observan porcentajes reducidos de presencia del gen KIR2DL2+ tanto en pacientes con cirrosis alcohólica viral o no viral (56.0% y 50.0%, respectivamente).

También se analizó la frecuencia de los genes inhibidores KIR2DL3 y KIR3DL1, pero no se observaron diferencias entre la población control y la enferma, así como tampoco se observaron diferencias entre la población con cirrosis alcohólica viral y no viral para estos genes.

El análisis de frecuencia de KIR2DL5, mostró similitud de frecuencias entre el total de controles sanos y la población enferma. A diferencia de KIR2DL2, la frecuencia de KIR2DL5 aparecía aumentada en la población de pacientes con cirrosis alcohólica sin infección viral respecto a la población control, pero en este caso la diferencia tampoco llegó a ser estadísticamente significativa (51.8% vs 60.0%, $P=0.193$).

Por otro lado, la frecuencia de genes activadores (aKIRs) en esta cohorte de pacientes presentó distribuciones similares en todos los grupos de estudio (Tabla 44).

No obstante, cabe destacar una disminución de la frecuencia de KIR2DS2+ en la población total de pacientes alcohólicos con edad menor a 54 años con respecto al grupo control (53.8% vs 59.6%, respectivamente) pero esta diferencia no fue significativa.

Por el contrario, KIR2DS3 aumentaba ligeramente en el grupo de pacientes respecto a los controles (33.1% vs 38.5%). Sin embargo, ninguna de estas diferencias resultó ser estadísticamente significativa.

Por otra parte, se observa un aumento en la frecuencia de KIR2DS5+ en el total de pacientes respecto a los controles sanos (27.1% vs 30.8%, respectivamente) no siendo este aumento estadísticamente significativo, como tampoco lo es, el aumento observado en la cohorte de pacientes con cirrosis alcohólica sin infección viral respecto a los controles sanos.

2.4. Análisis de regresión logística multivariable

Para confirmar los resultados del análisis univariable sobre la población total de pacientes con cirrosis alcohólica se realizó un análisis de regresión logística binaria, en el que la variable dependiente fue la cirrosis alcohólica.

En este análisis multivariable (tabla 45) se incluyeron las variables y los genes asociados a la cirrosis alcohólica del análisis univariante. Así se pudo confirmar que KIR2DL2 y KIR2DS5, se comportaban como variables dependientes asociados en cirrosis alcohólica, pero su influencia era de efecto contrario. Por una parte, KIR2DL2 se comportaba como un factor protector frente al desarrollo de la enfermedad, mientras que KIR2DS5 lo hace como factor de susceptibilidad ($P=0.006$ y $P=0.021$, respectivamente). Por otra parte, se confirmó que KIR2DL3 no se asociaba con el desarrollo de cirrosis alcohólica, al igual que para la variable edad, que aunque no fue estadísticamente significativa, mostró una tendencia estadística al desarrollo de cirrosis alcohólica.

Tabla 45. Análisis de regression logística multivariable

Grupo de pacientes	OR (95% CI)	P
Edad	1.010 (0.998-1.022)	0.098
KIR2DL2	0.612 (0.432-0.666)	0.006
KIR2DS5	1.519 (1.066-2.164)	0.021
KIR2DL3	0.648 (0.560-1.437)	0.539

OR: Odd Ratio. 95% IC: Intervalo de confianza al 95%. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales versus controles.

3. Estudio de asociación de genes KIR en individuos sanos y en el total de pacientes con cirrosis alcohólica

Para estudiar las relaciones existentes entre las diferentes parejas de genes KIR se realizó un estudio para valorar la asociación génica entre los genes KIR de un individuo, tanto en controles sanos (N=319), como en la población total de pacientes varones con cirrosis alcohólica (N=281).

En la figura 76 se muestran las frecuencias conjuntas entre genes dos KIR diferentes en el grupo de controles sanos (figura 76A) y el total de pacientes con cirrosis alcohólica (figura 76B), mostrando en colores más intensos las asociaciones genéticas más fuertes y en colores menos intensos las asociaciones más débiles entre dos genes KIR.

En la figura 76C, se comparan las diferentes frecuencias de asociación entre ambas poblaciones (figura 76A y 76B), con la finalidad de encontrar diferencias en los patrones de asociación entre genes KIR, mostrándose las significaciones ($P < 0.05$) obtenidas al comparar ambos grupos.

La figura 76A muestra la asociación entre pares genes KIR en el grupo de controles sanos. Si analizamos la figura de izquierda a derecha (parte centromérica a telomérica), cabe destacar, como era de esperar, que el gen activador KIR2DS2 se encuentra fuertemente asociado a KIR2DL2 (97%) en la población control, y que KIR2DL3 se encuentra asociado a KIR2DL2/S2 solamente en un 51% de la población sana.

Otras asociaciones fuertes, son las observadas en el gen KIR2DL1/KIR2DL3, con una frecuencia del 89%. Por el contrario, KIR2DL1 se encuentra asociado solamente en un 62% con los genes KIR2DL2/S2 y en un 40% con KIR2DS3.

Figura 76A. Patrones de ligamiento de los controles sanos (N=319)

Parte centromérica							
3DL3	63	88	63	34	99	98	100
	2DS2	51	97	67	62	61	63
		2DL3	51	35	89	90	88
			2DL2	67	62	61	63
				2DS3	40	35	34
					2DL1	99	99
						2DP1	98
							3DP1

Parte telomérica							
100	95	40	27	37	95	100	
63	60	53	44	51	60	63	
84	83	46	36	43	83	87	
63	61	53	42	51	61	63	
34	34	68	56	65	33	34	
98	94	41	28	38	94	98	
98	93	42	29	39	93	98	
100	95	40	27	37	95	100	
2DL4	95	40	27	37	95	99	
	3DL1	36	24	33	99	95	
		3DS1	84	94	36	40	
			2DS5	87	25	27	
				2DS1	33	37	
					2DS4	95	
							3DL2

Figura 76B. Patrones de ligamiento de los pacientes con cirrosis alcohólica (N=281)

Parte centromérica							
3DL3	52	89	53	33	98	98	100
	2DS2	41	99	72	50	50	52
		2DL3	42	28	91	92	89
			2DL2	71	51	51	53
				2DS3	36	36	33
					2DL1	100	98
						2DP1	98
							3DP1

Parte telomérica							
100	95	47	35	42	95	100	
52	50	59	57	58	49	52	
88	86	48	40	43	85	89	
53	51	60	56	58	50	53	
33	34	64	56	64	34	33	
98	95	47	36	42	93	98	
97	96	47	35	42	94	98	
100	95	47	35	42	95	100	
2DL4	95	47	35	42	94	100	
	3DL1	42	31	38	100	95	
		3DS1	87	94	42	47	
			2DS5	89	30	35	
				2DS1	37	42	
					2DS4	95	
							3DL2

Figura 76 C. Valor de P obtenido al comparar la frecuencia de genes KIR entre ambas poblaciones

Parte centromérica								Parte telomérica							
3DL3	0.006	0.798	0.016	0.863	0.483	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.041	0.241	1.000	1.000	
	2DS2	0.014	0.097	0.215	0.003	0.007	0.006	0.006	0.017	0.139	0.002	0.101	0.009	0.006	
		2DL3	0.027	0.079	0.391	0.392	0.798	0.197	0.312	0.682	0.354	1.000	0.577	0.530	
			2DL2	0.290	0.006	0.013	0.016	0.016	0.013	0.084	0.000	0.000	0.007	0.016	
				2DS3	0.313	0.864	0.863	0.863	1.000	0.342	1.000	0.864	0.795	0.863	
					2DL1	0.252	0.483	1.000	0.720	0.161	0.035	0.317	0.620	1.000	
						2DP1	1.000	0.590	0.150	0.249	0.137	0.454	0.741	1.000	
							3DP1	1.000	1.000	0.099	0.041	0.241	1.000	0.193	
								2DL4	1.000	0.099	0.041	0.241	0.595	0.252	
									3DL1	0.154	0.067	0.200	0.252	1.000	
										3DS1	0.356	1.000	0.154	0.099	
											2DS5	0.530	0.199	0.041	
												2DS1	0.304	0.241	
													2DS4	1.000	
														3DL2	

Figura 76. Frecuencias de asociación conjunta (valores de 0-100%) entre las parejas de genes KIR. (A) Frecuencia conjunta entre individuos sanos. (B) Frecuencia conjunta entre pacientes. Los tonos más claros indican menor asociación y los tonos más oscuros indican una mayor asociación. (C) Valor de P obtenido al comparar a los controles sanos con los pacientes con cirrosis alcohólica. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. Valores de $P < 0.05$ están marcados en negrita. Negro: 80-100%; Gris oscuro: 45-79%; Gris claro: <45%.

Igualmente el gen KIR2DL4 se asocia fuertemente con KIR2DL1 (98%) y KIR2DL3 (84%), y más débilmente con KIR2DS3 (34%). Resultados similares fueron observados al analizar la asociación de KIR2DL4/KIR3DP1. Por otro lado, todos estos datos fueron muy similares a los obtenidos con KIR3DL1, debido a la fuerte asociación presente entre el gen KIR2DL4/KIR3DL1 (95%).

En cuanto a los genes activadores, KIR2DS1 se encontró fuertemente asociado a KIR2DS5 (87%) y a KIR3DS1 (94%). El análisis de frecuencias mostró también como el gen activador KIR2DS4 se encuentra en la población sana fuertemente asociado con KIR2DL3 (83%), KIR2DL4 (95%) y KIR3DL1 (99%).

En cuanto al gen activador KIR2DS5 se encontró asociado a KIR3DS1 con una frecuencia del 84%, y a KIR2DS3 con una frecuencia del 56%, seguida de KIR2DS2 (44%) y KIR2DL2 (42%). Por el contrario, se observó una débil asociación con KIR2DL3 (36%). El resto de asociaciones genéticas de KIR2DS5 fueron inferiores al 45%.

Posteriormente se realizó el mismo análisis en la población total de enfermos con cirrosis alcohólica (Figura 76B). En dicho análisis se pudo observar que la frecuencia de asociación entre genes KIR fue bastante similar a la observada en la población sana.

Al comparar la población de pacientes con controles, se observó una frecuencia de asociación más baja entre KIR2DL2/S2 y el resto de genes KIR en los pacientes con cirrosis alcohólica, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, a excepción de la asociación entre KIR2DS5 con KIR2DL2 (56%) y KIR2DS2 (57%) que se encontraba aumentada en los pacientes ($P<0.001$ y $P=0.002$, respectivamente), como se observa en la figura 76C. Este aumento también fue observado entre KIR2DS5/KIR3DL3 ($P=0.041$), KIR2DS5/KIR2DL1 ($P=0.035$), y KIR2DS1/KIR2DL2 ($P<0.001$).

Por el contrario, se observa una disminución estadísticamente significativa de la presencia de los genes KIR2DL2/KIR3DL3 ($P=0.016$), KIR2DL2/KIR2DL3 ($P=0.027$), y KIR3DL1/2DS2 ($P=0.017$) en pacientes con cirrosis alcohólica respecto al grupo control.

4. Frecuencia de asociación conjunta de KIR2DS5 y KIR2DS2 en individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica

A la vista de los datos obtenidos para KIR2DS5 y KIR2DS2/KIR2DL2 se verificó su asociación en la población sana, y de su tasa positiva de asociación (17% y 16%, respectivamente), es decir, la frecuencia en la que ambos se encuentran asociados (figura 77A). En un segundo análisis, se calculó la asociación de KIR2DS5 con KIR2DS2/KIR2DL2, y se evaluó la ausencia de ambos genes en la población sana. Así se obtuvo una tasa de asociación negativa del 27 % y 26% respectivamente (figura 77B).

Figura 77A. Ambos genes positivos

Parte centromérica								Parte telomérica							
3DL3	63	88	63	34	99	98	100	100	95	40	27	37	95	100	
	2DS2	51	62	32	62	61	63	63	59	28	17	26	59	63	
		2DL3	51	28	88	88	88	84	83	37	25	34	83	87	
			2DL2	32	62	61	63	63	60	28	16	26	60	63	
				2DS3	33	33	34	34	31	21	8	18	31	34	
					2DL1	98	99	98	94	40	27	37	94	98	
						2DP1	98	98	93	40	27	37	93	98	
							3DP1	100	95	40	27	37	95	100	
								2DL4	95	40	27	37	95	99	
									3DL1	36	23	33	95	95	
										3DS1	26	36	36	40	
											2DS5	26	24	27	
												2DS1	33	37	
													2DS4	95	
														3DL2	

Figura 77B. Ambos genes negativos

Parte centromérica								Parte telomérica							
3DL3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2DS2	0	35	35	0	0	0	0	0	1	25	27	25	1	0
		2DL3	0	7	1	2	0	0	0	0	9	11	9	0	0
			2DL2	35	0	0	0	0	0	1	25	26	25	1	0
				2DS3	7	2	0	0	0	3	47	48	47	2	0
					2DL1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
						2DP1	0	0	0	0	2	2	2	0	0
							3DP1	0	0	0	0	0	0	0	0
								2DL4	0	0	0	0	0	0	0
									3DL1	0	1	0	0	4	0
										3DS1	58	58	0	0	0
											2DS5	61	1	0	0
												2DS1	0	0	0
													2DS4	0	0
															3DL2

Figura 77. Asociación de los genes KIR de controles sanos (N=319) organizados por su localización telomérica y centrométrica. Fuerza de ligamiento (valores de 0-100%) entre los diferentes genes KIR. Los tonos más claros indican menor desequilibrio de ligamiento y los tonos más oscuros indican una mayor desequilibrio de ligamiento. Negro: 80-100%; Gris oscuro: 45-79%; Gris claro: <45%.

El mismo análisis se aplicó en la población enferma, y de este modo la presencia de ambos genes simultáneamente fue del 22%, siendo ligeramente superior a la observada en individuos sanos (figura 78A). Cuando se analizó la ausencia de KIR2DS5 y KIR2DS2/KIR2DL2, la tasa de colocación negativa fue del 35 % y 34% respectivamente (figura 78B), bastante superior a la encontrada en la población sana.

Figura 78A. Ambos genes positivos

Parte centromérica								Parte telomérica						
3DL3	52	89	53	33	98	98	100	100	95	47	35	42	95	0
	2DS2	41	52	29	50	50	52	52	49	29	22	26	48	52
		2DL3	42	25	89	89	89	88	85	42	32	37	84	89
			2DL2	29	51	51	53	53	50	30	22	27	49	53
				2DS3	34	34	33	33	31	22	12	20	31	33
					2DL1	98	98	98	94	46	35	41	93	98
						2DP1	98	97	94	46	34	41	93	98
							3DP1	100	95	47	35	42	95	100
								2DL4	95	47	35	42	94	100
									3DL1	42	31	38	95	95
										3DS1	35	42	42	47
											2DS5	33	30	35
												2DS1	37	42
													2DS4	95
														3DL2

Figura 78B. Ambos genes negativos

Parte centromérica								Parte telomérica						
3DL3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2DS2	0	47	43	0	0	0	0	1	30	35	32	1	0
		2DL3	0	3	2	3	0	0	0	1	6	8	6	1
			2DL2	42	0	0	0	0	0	1	30	34	31	1
				2DS3	2	2	0	0	0	3	42	44	44	3
					2DL1	2	0	0	0	1	1	1	1	0
						2DP1	0	0	0	2	1	1	1	1
							3DP1	0	0	0	0	0	0	0
								2DL4	0	0	0	0	0	0
									3DL1	0	0	0	5	0
										3DS1	52	52	0	0
											2DS5	56	0	0
												2DS1	0	0
													2DS4	0
														3DL2

Figura 78. Asociación de los genes KIR de pacientes enfermos organizados por su localización telomérica y centrométrica N=281. Fuerza de ligamiento (valores de 0-100%) entre los diferentes genes KIR. Los tonos más claros indican menor desequilibrio de ligamiento y los tonos más oscuros indican una mayor desequilibrio de ligamiento. Negro: 80-100%; Gris oscuro: 45-79%; Gris claro: <45%.

5. Análisis de la frecuencia de KIR2DS5 y KIR2DS2 en individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica.

En un segundo análisis, profundizamos más en las relaciones de estos dos genes en nuestras poblaciones de individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica, considerando para ello las cuatro combinaciones posibles entre ambos genes (tabla 46).

Tabla 46. Frecuencia combinada de los genes KIR2DS5 y KIR2DS2 en el total de pacientes varones con cirrosis alcohólica

		Pacientes con cirrosis alcohólica							
		Controles	Pacientes			Sin virus	Con virus		
		Sanos	totales						
		N=319	N=281			N=213	N=68		
P/A		n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
KIR2DS5+	S2+	54 (16.9)	61 (21.8)	0.880	51 (24)	10 (14.7)	0.755	0.765	0.557
KIR2DS5+	S2-	32 (10.0)	38 (13.5)		34 (16)	4 (5.8)			
KIR2DS5-	S2+	147 (46.1)	85 (30.2)	0.001^a	58 (27.2)	27 (39.7)	0.001^b	0.089	0.627
KIR2DS5-	S2-	86 (27.0)	97 (34.5)		70 (32.9)	27 (39.7)			

P, presencia; A, ausencia; N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus. ^a OR=1.951, 95% IC: 1.315-2.894, $P=0.001$; ^b OR=2.063, 95% IC: 1.331-3.197, $P=0.001$;

Como se deduce de la tabla 46, la frecuencia de KIR2DS5+/KIR2DS2+ en la población sana fue más baja que la población enferma (16.9% vs 21.8%, respectivamente), pero dicha disminución no fue estadísticamente significativa. Las frecuencias de esta combinación de genes en la población alcohólica no infectada por virus, experimentaba un ligero aumento respecto a los controles de hasta un 24%, que tampoco fue estadísticamente significativo, mostrando esta combinación de genes indicaciones de cierta susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Por el contrario, la frecuencia de asociación de KIR2DS5+/KIR2DS2+ en la población de cirrosis alcohólica afectada por infección viral resultó ser similar a la de los individuos sanos.

La frecuencia de la presencia de KIR2DS5 en ausencia de KR2DS2 (población KIR2DS5+/KR2DS2-) fue solo de un 10% en la población sana, y de un 13.5% en la

población enferma (tabla 46), de los cuales la mayoría no presentaban infección viral (16%).

Posteriormente, al analizar la frecuencia de KIR2DS5-/KIR2DS2+ en la población sana alcanzó un 46.1%, mientras que en la población enferma solo representó un 30.2%, y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P=0.001$).

Además, se comparó el grupo de pacientes sin virus con los controles sanos para esta misma combinación de genes, y se observó un descenso estadísticamente significativo en relación al grupo control (46.1% vs 27.2%, OR=2.063, 95% IC: 1.331-3.197, $P=0.001$). Por el contrario, las diferencias no fueron significativas en el caso de los pacientes cirróticos con virus asociado.

Finalmente, la doble ausencia de estos genes (KIR2DS5-/KIR2DS2-), resultó ser del 27% en la población sana y de un 34.5% de la población enferma, observándose un comportamiento similar en la cohorte de pacientes con virus (39.7%) y sin virus (32.9%).

5.1. Análisis de la frecuencia de KIR2DS5 y KIR2DS2 en individuos sanos y pacientes con cirrosis alcohólica con edad inferior a 54 años

Posteriormente, se realizó un equiparable análisis sobre la población de pacientes con cirrosis alcohólica menores de 54 años. Sin embargo, en este caso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo control con la población enferma (tabla 47).

Tabla 47. Frecuencia de los genes activadores KIR2DS5 y KIR2DS2 en pacientes varones con cirrosis alcohólica menores 54 años

		Pacientes con cirrosis alcohólica							
		Controles	Pacientes			Sin virus		Con virus	
		Sanos	totales			N=91		N=52	
		N=166	N=143			N=91		N=52	
P/A		n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
KIR2DS5+	S2+	28 (16.9)	30 (21)	0.658	22 (24.2)	8 (15.4)	0.812	0.728	1.000
KIR2DS5+	S2-	17 (10.2)	14 (9.8)		11 (12.1)	3 (5.8)			
KIR2DS5-	S2+	71 (42.8)	47 (33)	0.105	29 (32)	18 (34.6)	0.335	0.107	0.683
KIR2DS5-	S2-	50 (30.1)	52 (36.4)		29 (32)	23 (44.2)			

P, presencia; A, ausencia; N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus.

5.2. Análisis de la frecuencia de KIR2DS5 y KIR2DS2 en individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica con edad superior a 54 años

Al realizar el análisis sobre la población de pacientes con cirrosis alcohólica mayores de 54 años se observaron las mismas tendencias en la frecuencia que las observadas al considerar toda la población sin sesgo de edad.

Cuando este grupo de pacientes se comparó con el de individuos sanos, se observó una disminución estadísticamente significativa de la frecuencia de KIR2DS5-/KIR2DS2+ (49.7% vs 27.5%, $P=0.003$). Igualmente se encontró una disminución en los pacientes sin virus (49.7% vs 23.7%, $P=0.001$), pero no así en la población de pacientes con cirrosis alcohólica e infecciones virales asociadas, donde lejos de disminuir la frecuencia de KIR2DS5-/KIR2DS2+, aumentaba, aunque esta diferencia no resultó significativa (tabla 48).

Por otro lado, al analizar la ausencia de ambos genes (KIR2DS5-/KIR2DS2-), se observó un aumento de los pacientes respecto al grupo control (32.6% vs 23.5%, respectivamente), y este aumento era debido a una mayor frecuencia de pacientes sin virus que con virus.

Tabla 48. Frecuencia de los genes activadores KIR2DS5 y KIR2DS2 en pacientes varones con cirrosis alcohólica mayores 54 años

Pacientes con cirrosis alcohólica									
		Controles	Pacientes		Sin	Con			
		Sanos	totales		virus	virus			
		N=153	N=138		N=122	N=16			
P/A		n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
KIR2DS5+	S2+	26 (17.0)	31 (22.4)	0.533	29 (23.7)	2 (12.5)	0.527	1.000	1.000
KIR2DS5+	S2-	15 (9.8)	24 (17.4)		23 (18.9)	1 (6.25)			
KIR2DS5-	S2+	76 (49.7)	38 (27.5)	0.003^a	29 (23.7)	9 (56.3)	0.001^b	1.000	0.077
KIR2DS5-	S2-	36 (23.5)	45 (32.6)		41 (33.6)	4 (25)			

P, presencia; A, ausencia; N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus. ^a, OR=2.500, 95% IC: 1.391-4.493, P=0.003; ^b, OR=2.985, 95% IC: 1.607-5.544, P=0.001.

6. Análisis de genotipos y haplotipos KIR generales y específicos en individuos sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica

En este análisis, los pacientes y controles sanos se clasificaron en tres genotipos KIR generales en base a la composición de genes KIR (AA, AB, BB) (ver pacientes y métodos). Un pequeño grupo de pacientes en el que no se pudo discriminar claramente su pertenencia a alguno de los dos genotipos anteriores, fue clasificado como AB/BB.

La inclusión de un individuo en cada uno de estos genotipos se hizo acorde a los criterios comentados en el apartado de pacientes y métodos.

Este permitió evidenciar, que según la distribución de frecuencias genotípicas en la población sana, el genotipo AA aparecía representado en un 23.5%, el genotipo AB en un 54.2%, y el BB en un 16.3%. Finalmente el pequeño grupo definido como AB/BB representó un 6% (tabla 49).

Una distribución de frecuencias similar fue observada cuando se examinó la población total de enfermos varones con cirrosis alcohólica, de tal manera que cuando se comparó con la población sana, no se observó diferencias en la distribución de genotipos KIR.

Cuando dicha distribución se analizó en la población de pacientes con cirrosis alcohólica sin virus y con virus, las distribuciones fueron también similares a las de la población sana, y por tanto, en ningún caso se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

Posteriormente, se analizó la presencia de **haplotipos KIR** (ver pacientes y métodos), y se pudo observar que el haplotipo A en la población sana representaba un 23.5% mientras que el haplotipo B fue de un 76.5%. Esta distribución fue similar tanto en el grupo total de pacientes con cirrosis alcohólica como en los grupos de pacientes sin y con infección viral concomitante. Estos resultados son similares a los descritos para otras poblaciones caucasoides.

Tabla 49. Genotipos y haplotipos KIR específicos en la población sana y en pacientes varones con cirrosis alcohólica con y sin infección viral asociada

Genotipo	Pacientes con cirrosis alcohólica							
	Controles	Pacientes						
	sanos	totales		Sin virus	Con virus			
	N=319	N=281		N=213	N=68			
	n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
Genotipo								
AA	77 (23.5)	82 (29.2)	0.165	62 (29.1)	20 (29.4)	0.192	0.357	1.000
AB	173 (54.2)	138 (49.1)	0.253	101 (47.4)	37 (54.4)	0.157	1.000	0.332
BB	52 (16.3)	44 (15.7)	0.911	35 (16.4)	9 (13.2)	1.000	0.713	0.702
AB/ BB	19 (6)	17 (6)	1.000	15 (7)	2 (2.9)	0.593	0.379	0.379
Haplotipo*								
A	77 (23.5)	82 (29.2)	0.165	62 (29.1)	20 (29.4)	0.192	0.357	1.000
B	244 (76.5)	199 (70.8)	0.165	151 (70.8)	48 (70.5)	0.192	0.357	1.000

N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. *El haplotipo A incluye a los individuos AA mientras que en el haplotipo B se incluye al resto de población (AB y BB). P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus.

6.1. Genotipos KIR específicos en población sana y pacientes con cirrosis alcohólica

En la figura 79, se muestra una recopilación de todos los genotipos KIR encontrados tanto en los controles sanos como en los individuos enfermos incluidos en este estudio. Tal y como puede observarse de izquierda a derecha de la figura, los genotipos fueron clasificados con un número de identificación (ID) tal como establece la base de datos Allele Frequencies KIR Database (<http://www.allelefrequencys.net>). También se pueden clasificar según el genotipo (AA, BB, AB, BX). Por otro lado, se puede analizar por el número de genes KIR totales (columna 4), así como el número de

genes KIR inhibidores (columna 5) y activadores (columna 6) presentes en cada uno de los genotipos encontrados.

Tras el análisis de los genotipos encontrados en nuestra población, se comprobó que todos ellos habían sido referenciados previamente.

Cada genotipos KIR específico (ID) fue obtenido para el total de pacientes con cirrosis alcohólica, y fueron ordenándose según frecuencias, recogiendo en la parte superior de la figura 79 los genotipos más representados y en la parte inferior los menos representados en nuestra población.

En nuestra cohorte de hombres con cirrosis alcohólica se identificaron un total de 39 genotipos KIR diferentes, mientras que en los grupos de cirrosis alcohólica no asociada a virus y asociada a virus solamente pudieron ser identificados 33 y 22 genotipos diferentes, respectivamente. Al igual que ocurre con el total de pacientes, en los grupos sin virus y con virus, los genotipos más representados quedaron posicionados en la parte superior de la figura.

Los genotipos más frecuentes encontrados en la población total de pacientes con cirrosis alcohólica fueron ID1 (AA, 29.2%) e ID4 (AB, 11.0%), los cuales estaban distribuidos de manera similar, tanto en los grupos de pacientes con infección como en los grupos sin infección viral, mientras que la frecuencia del genotipo ID2 fue más baja en pacientes con infecciones virales que no virales (5.9% vs 8.9%, respectivamente). En cuarta posición en la población enferma total se encontraba el genotipo el ID3 (7.5%). El resto de genotipos mostraron bajas frecuencias.

A continuación cada genotipo se clasificó teniendo en cuenta los haplotipos A y B, de modo que se obtuvo una frecuencia para el haplotipo A de 29.2% en la población total, y para el haplotipo B del 70.8%. Una distribución similar a la del resto de poblaciones caucasoides descritas previamente, fue corroborada de esta manera, tal

como se muestra en la figura 79. Estos datos confirman la presencia en nuestra población de un solo tipo de haplotipo A y una amplia variedad de haplotipos B, que generó una alta diversidad en los genotipos AB y BB de la población enferma. En total se observaron 19 y 18 genotipos diferentes respectivamente para AB y BB.

Cada uno de los genes KIR fue clasificado según su disposición centromérica o telomérica en el cromosoma y posteriormente se estudió la distribución en ambas posiciones de cada uno de los genes KIR, observándose una equilibrada distribución en ambas posiciones y no existiendo ningún predominio de la presencia o ausencia de genes KIR en una ubicación cromosómica específica.

Finalmente, se hizo un recuento del número total de genes KIR contenidos en cada genotipo, así como un recuento del número de genes KIR inhibidores (iKIR) y genes KIR activadores (aKIR), no observándose ninguna tendencia en ningún caso.

Figura 79. Genotipos KIR específicos, número y tipo de genes KIR en la población total de pacientes con cirrosis alcohólica y en presencia o ausencia de infecciones virales

[illegible]

7. Análisis del número de genes KIR en pacientes con cirrosis alcohólica y en controles sanos

En este apartado se analizó el número de genes KIR de cada grupo de estudio, para conocer si la cantidad de genes KIR de un individuo, tanto activadores (aKIR) como inhibidores (iKIR), influían en el desarrollo de cirrosis hepática alcohólica.

7.1. Análisis del total de genes KIR contenidos en los diferentes genotipos KIR

Cuando se revisó el número total de genes KIR (activadores e inhibidores), en el grupo total de pacientes con cirrosis alcohólica (con y sin infección viral asociada), y se comparó con la población control sana, no se encontraron diferencias significativas entre las distintas poblaciones (tabla 50).

Sin embargo, la presencia de cuatro genes KIR era menor en controles (24.5%) que en el grupo total de pacientes con cirrosis alcohólica (29.9%), cuyas diferencias fueron estadísticamente significativas (OR=0.290, 95% IC: 0.102-0.830, $P=0.020$). Además, al comparar los controles y los pacientes con infección viral, las diferencias se mantuvieron, pero el nivel de significación fue menor (OR=0.152, 95% IC: 0.034-0.687, $P=0.005$).

Tabla 50. Análisis de la frecuencia del número de genes KIR totales (iKIRs+aKIRs) en individuos sanos y pacientes con cirrosis alcohólica

Nº aKIRs+iKIRs	Controles sanos N=319 n (%)	Pacientes con cirrosis alcohólica		
		Pacientes totales N=281 n (%)	Sin virus N=213 n (%)	Con virus N=68 n (%)
4	78 (24.5%)	84 (29.9%)^a	64 (30.0%)	20 (29.4%)^b
5	16 (5.0%)	5 (1.8%)	2 (0.9%)	3 (4.4%)
6	54 (16.9%)	35 (12.5%)	25 (11.7%)	10 (14.7%)
7	22 (6.9%)	21 (7.5%)	18 (8.5%)	3 (4.4%)
8	67 (21.0%)	60 (21.4%)	45 (21.1%)	15 (22.1%)
9	25 (7.8%)	22 (7.8%)	17 (8.0%)	5 (7.4%)
10	38 (11.9%)	35 (12.5%)	25 (11.7%)	10 (14.7%)
11	19 (6.0%)	19 (6.8%)	17 (8.0%)	2 (2.9%)

aKIRs, genes KIR activadores. iKIRs, genes KIR inhibidores. N, número total de individuos en cada población. n, número de individuos para la variable considerada. aKIRs+iKIRs: 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1; 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1. Los genes constitutivos (2DL4 y 3DL2-3) y los pseudogenes (2DP1 y 3DP1) han sido excluidos de este análisis. Las comparaciones fueron realizadas mediante el test estadístico exacto de Fischer. ^a. Valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con controles sanos; OR=0.290, 95% IC: 0.102-0.830, **P=0.020**. ^b. Valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica e infección viral asociada con controles sanos; OR=0.152, 95% IC: 0.034-0.687, **P=0.005**.

La figura 80 muestra que los genotipos que contenían 4 genes KIR (tanto activadores como inhibidores), fueron los más representados tanto en la población sana como enferma, y los siguientes en frecuencia fueron los genotipos que contienen 8 genes KIR. Sin embargo, por lo general el número de genes KIR en la población sana y enferma fueron muy similares para el grupo total de pacientes con cirrosis y también para los grupos sin y con infección viral.

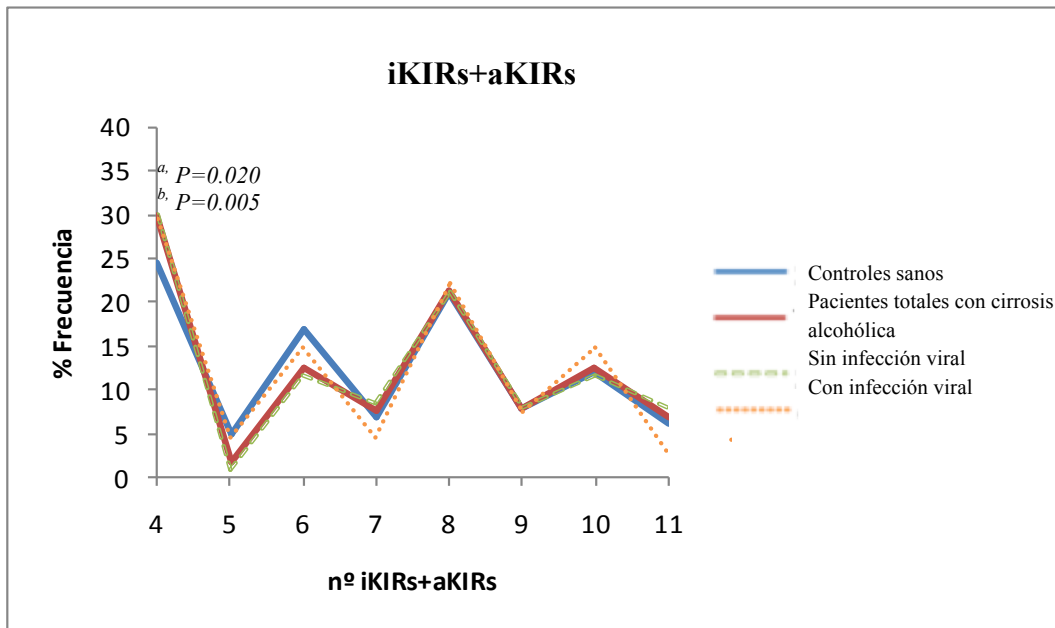


Figura 80. Número total de genes KIR (aKIR+ iKIR) en pacientes con cirrosis alcohólica. aKIRs, genes KIR activadores. iKIRs, genes KIR inhibidores. La línea azul representa a los controles sanos, la roja a los pacientes con cirrosis alcohólica, la verde a aquellos pacientes con cirrosis alcohólica que no presentan infección viral asociada, y la línea naranja representa a los pacientes con cirrosis alcohólica con infección viral asociada. aKIRs+iKIRs: KIR2DS1-5, KIR2DL1-3, KIR2DL5, KIR3DS1/L1. Los genes constitutivos (KIR2DL4 y KIR3DL2-3) y los pseudogenes (KIR2DP1 y KIR3DP1) han sido excluidos de este análisis. Las comparaciones fueron realizadas mediante el test estadístico exacto de Fischer. ^a, Valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; OR =0.290, 95% IC: 0.102-0.830, $P=0.020$. ^b, Valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica e infección viral asociada con controles sanos; OR=0.152, 95% IC: 0.034-0.687, $P=0.005$.

A continuación desglosamos la población total de pacientes con cirrosis alcohólica en base a la presencia o ausencia de infecciones virales.

La comparación de las frecuencias de la población de individuos sanos y pacientes con cirrosis alcohólica sin infecciones virales, mostró la cirrosis alcohólica era más frecuente en individuos portadores de 4, 7 y 11 genes KIR, respecto a la población control, aunque las diferencias no alcanzaron estadísticamente significativas. Por el contrario la frecuencia de individuos con cirrosis alcohólica que portaban 5 y 6 genes KIR totales en su genotipo, disminuían respecto a la población control sana, pero tampoco estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

Finalmente se observó una distribución similar de frecuencias de individuos portadores de 8, 9 y 10 genes KIR en individuos sanos respecto a pacientes con cirrosis alcohólica no asociada a infección viral. Resultados similares fueron obtenidos al comparar la población sana control con el grupo de pacientes con cirrosis alcohólica infectados por virus.

7.2. Genes KIR inhibidores presentes en los diferentes genotipos KIR de población sana y con cirrosis alcohólica

Cuando se analizó el número total de genes KIR inhibidores presentes en los genotipos del total de pacientes con cirrosis alcohólica, y en los subgrupos de cirrosis con o sin infecciones virales, y se establecieron comparaciones con una población sana tomada como control, no se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas en ningún caso (tabla 51).

Tabla 51. Análisis de la frecuencia del número de genes iKIRs en individuos sanos y pacientes con cirrosis alcohólica

Nº iKIRs	Controles sanos N=319	Pacientes totales N=281	Pacientes con cirrosis alcohólica	
			Sin virus N=213	Con virus N=68
			n (%)	n (%)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
2	4 (1.3%)	3 (1.1%)	2 (0.9%)	1 (1.5%)
3	98 (30.7%)	95 (33.8%)	72 (33.8%)	23 (33.8%)
4	117 (36.7%)	106 (37.7%)	82 (38.5%)	24 (35.3%)
5	100 (31.3%)	77 (27.4%)	57 (26.8%)	20 (29.4%)

iKIRs, genes KIR inhibidores. iKIRs: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1. N, número total de individuos en cada población. n, número de individuos con cada variable. Las comparaciones fueron realizadas mediante el test estadístico exacto de Fischer.

En la figura 81 se muestran datos de los genotipos menos frecuentes en ambas poblaciones, que fueron las que contenían solamente 2 genes iKIR, mientras que los más representados fueron los que portaban de 3 a 5 genes iKIR, pero no se encontraron diferencias significativas en ningún caso.

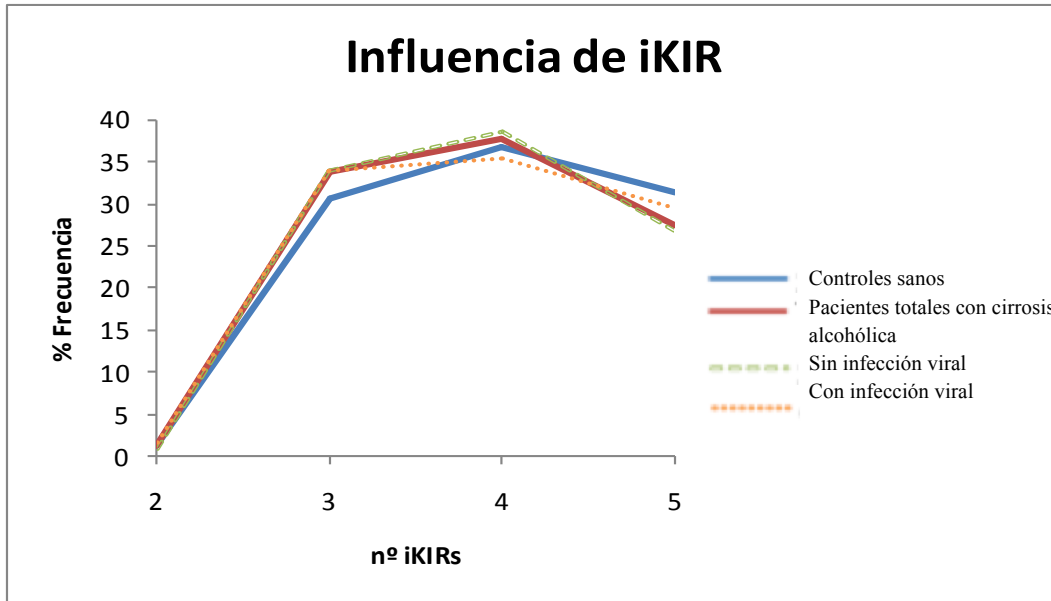


Figura 81. Análisis del número total de genes iKIR en pacientes con cirrosis alcohólica. iKIRs: genes KIR inhibidores. Genes iKIR considerados: KIR2DL1-3, KIR2DL5, KIR3DL1. La línea azul representa a los controles sanos, la roja a los pacientes con cirrosis alcohólica, la verde a aquellos pacientes con cirrosis alcohólica que no presentan infección viral asociada, y la línea naranja representa a los pacientes con cirrosis alcohólica con infección viral asociada.

A continuación, se desglosó en dos sobre la base de la población total de pacientes con cirrosis alcohólica en base a la presencia o ausencia de infecciones virales asociadas (n=213 vs n=68, respectivamente), y las frecuencias de iKIR en la población de individuos sanos se compararon con las de pacientes con cirrosis alcohólica con y sin infecciones virales asociadas. En ningún caso se encontraron diferencias en el número de genes iKIR (tabla 51).

7.3. Estudio del impacto de genes KIR activadores en cirrosis alcohólica

Posteriormente se valoró la influencia del total de genes aKIRs presentes en la población de pacientes con cirrosis alcohólica, donde también se tuvo en cuenta la presencia o ausencia de infecciones virales. En este caso, cuando se compararon datos de las poblaciones enfermas, se pudieron demostrar diferencias estadísticamente

significativas para los portadores de 2 genes KIR activadores, ya que su frecuencia en individuos sanos aparecía significativamente aumentada en la población control respecto a la población total de pacientes con cirrosis alcohólica (21.3% vs 13.5%, respectivamente). Tales diferencias significativas fueron debidas a una disminución de estos genotipos en individuos con cirrosis alcohólica no infectados por virus (21.3% vs 12.2%), tal como se muestra en la tabla 52.

Tabla 52. Análisis de la frecuencia del número de genes aKIRs en individuos sanos y pacientes con cirrosis alcohólica

	Controles sanos N=319	Pacientes con cirrosis alcohólica		
		Pacientes totales N=281	Sin virus N=213	Con virus N=68
Nº aKIRs	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	78 (24.5%)	83 (29.5%)	63 (29.6%)	20 (29.4%)
2	68 (21.3%)	38 (13.5%)^a	26 (12.2%)^b	12 (17.6%)
3	46 (14.4%)	36(12.8%)	26(12.2%)	10 (14.7%)
4	57 (17.9%)	54 (19.2%)	42 (19.7%)	12 (17.6%)
5	50 (15.7%)	48 (17.1%)	38 (17.8%)	10 (14.7%)
6	20 (6.3%)	22 (7.8%)	18 (8.5%)	4 (5.9%)

aKIRs, genes KIR activadores. aKIRs: 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1. N, número total de individuos en cada población. n, número de individuos con cada variable. Las comparaciones fueron realizadas mediante el test estadístico exacto de Fischer. ^a, Valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con controles sanos; OR=1.732; 95% IC: 1.122-2.675, $P=0.014$. ^b, Valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin infección viral asociada con controles sanos; OR=1.949; 95% IC: 1.194-3.181, $P=0.008$.

Tal como se muestra en la figura 82 los genotipos según su contenido en genes KIR activadores están similarmente representados en pacientes y controles, excepto para el caso de 2 genes aKIR, con diferencias significativas entre ambos grupos (OR=1.732; 95% IC: 1.122-2.675, $P=0.014$).

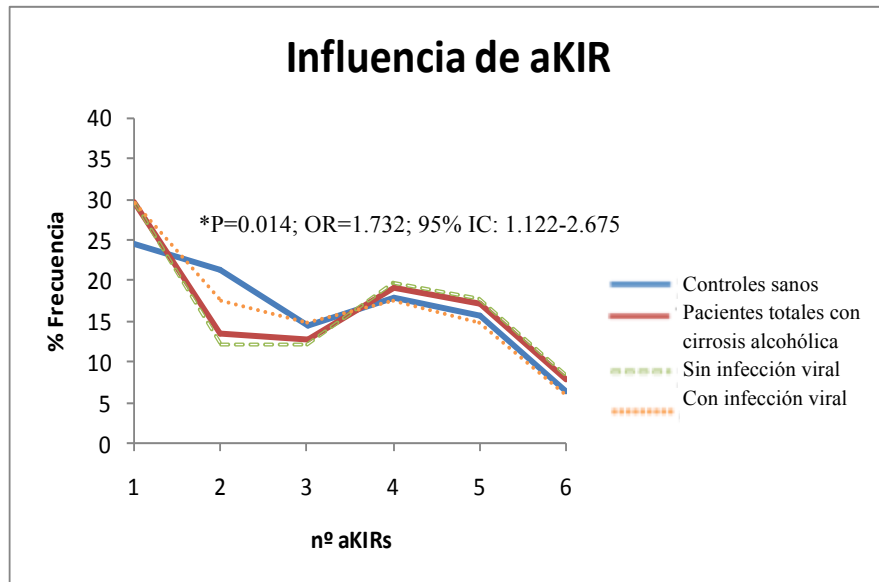


Figura 82. Número total de genes aKIR en pacientes con cirrosis alcohólica. aKIRs, genes KIR activadores. aKIRs: 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1. La línea azul representa a los controles sanos, la roja a los pacientes con cirrosis alcohólica, la verde a aquellos pacientes con cirrosis alcohólica que no presentan infección viral asociada, y la línea naranja representa a los pacientes con cirrosis alcohólica con infección viral asociada. Las comparaciones fueron realizadas mediante el test estadístico exacto de Fischer. ^a OR=1.732; 95% IC: 1.122-2.675, $P=0.014$; ^b OR=1.949; 95% IC: 1.194-3.181, $P=0.008$.

8. Papel del locus HLA-C en la cirrosis hepática alcohólica

8.1. Frecuencia de alelos HLA-C

El estudio de frecuencias de alelos HLA-C en controles y en pacientes con cirrosis alcohólica con y sin infección viral asociada se resume en la tabla 53, donde se puede observar que en ninguno caso hubo diferencias en la distribución alélica entre controles y pacientes.

Tabla 53. Frecuencia de los distintos alelos HLA-C en controles y pacientes con cirrosis alcohólica.

Alelos HLA-C	Grupo C1	Grupo C2	Pacientes con cirrosis alcohólica							
			Controles sanos N=319	Pacientes totales		Sin virus N= 213	Con virus N=68			
				n (%)	P1		n (%)	P2	P3	P4
C*01	+		18 (5.7)	13 (4.8)	0.712	10 (4.9)	3 (4.4)	0.696	1.000	1.000
C*02		+	28 (8.9)	35 (12.9)	0.145	26 (12.7)	9 (13.2)	0.241	0.259	0.834
C*03	+		41 (13)	33 (12.1)	0.710	24 (11.8)	9 (13.2)	0.686	1.000	0.668
C*04 ^a		+	77 (24.4)	75 (27.6)	0.511	61 (29.9)	14 (20.6)	0.267	0.637	0.211
C*05		+	59 (18.7)	51 (18.8)	1.000	36 (17.6)	15 (22.1)	0.729	0.499	0.367
C*06		+	53 (16.8)	46 (16.9)	1.000	33 (16.3)	13 (19.1)	0.810	0.598	0.459
C*07	+		140 (44.3)	109 (40.1)	0.214	77 (37.7)	32 (47.1)	0.087	0.687	0.117
C*08	+		25 (7.9)	31 (11.4)	0.206	22 (10.8)	9 (13.2)	0.206	0.351	0.509
C*12	+	+	59 (18.7)	41 (15.1)	0.228	33 (16.2)	8 (11.8)	0.414	0.218	0.556
C*14	+		14 (4.4)	7 (2.6)	0.270	6 (2.9)	1 (1.5)	0.486	0.486	1.000
C*15		+	18 (5.7)	21 (7.7)	0.409	18 (8.8)	3 (4.4)	0.221	1.000	0.426
C*16	+		49 (15.5)	39 (14.3)	0.645	27 (13.2)	12 (17.6)	0.448	0.714	0.317
C*17		+	9 (2.8)	12 (4.4)	1.000	8 (3.9)	4 (5.9)	0.618	0.256	0.492

N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de genotipo HLA-C. (+) presencia del alelo. () no presencia del alelo. Las comparaciones fueron hechas por el Test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus.

8.2. Distribución de epítomos y genotipos HLA-C

La presencia de los aminoácidos asparagina (Asn) o lisina (Lys) en posición 80 de la hélice- α 1 de la molécula de HLA-C determina que los distintos alelos de HLA-C actúen como ligandos de los receptores KIR2DL2/3/S2 o de los KIR2DL1/S1 y se puedan clasificar en dos grupos de alelos HLA-C (HLA-C1 y HLA-C2), como ya se comentó en el apartado de pacientes y métodos.

Debido a la importancia de estos epítomos Asn y Lys en la interacción del genotipo HLA-C como ligando de receptores KIR2D, se estudió la posible influencia de la presencia de estos epítomos en la población de pacientes y controles sanos, y se evaluó su influencia sobre la aparición de cirrosis alcohólica (tabla 54). Así, se observó que el número de pacientes que carecían del epítomo C1 estaba significativamente aumentado en la población de cirrosis alcohólica comparada con la de los controles sanos (OR=1.761; 95% CI:1.184-2.621, $P=0.007$). Resultados similares fueron observados en el grupo de pacientes sin infección viral asociada (OR=1.834; 95% CI:1.201-2.799, $P=0.006$). Sin embargo, el análisis de la presencia o ausencia del epítomo C2 no mostró diferencias entre la cohorte de individuos sanos y enfermos.

Un análisis posterior de genotipos HLA-C se realizó también sobre la misma cohorte de individuos y con él se pudo demostrar por una parte, una distribución similar del genotipo C1C1 en controles y pacientes, mientras que los genotipo C1C2 y C2C2 estuvieron diferentemente distribuidos en controles sanos y pacientes (tabla 54).

Así, el genotipo C1C2 heterocigoto presentó una frecuencia menor en pacientes que en controles sanos (46.3% vs 52.5%, respectivamente), pero esta diferencia no alcanzó significación estadística.

Por otro lado, el genotipo C2C2 aparecía significativamente aumentado en pacientes con cirrosis alcohólica respecto a controles sanos (15.3% vs 23.5%, $P=0.015$).

Resultados similares fueron obtenidos al comparar la población de individuos sanos con la población de enfermos sin infección viral asociada (15.3% vs 23.5%, $P=0.021$).

Tabla 54. Frecuencia de epítomos y genotipos HLA-C en controles sanos y pacientes con cirrosis alcohólica

Epítomos HLA-C	Controles	Pacientes con cirrosis alcohólica						
	Sanos	Pacientes		Sin virus		Con virus		
	N=319	totales		N=213		N=68		
	n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
C1+	266 (84.7)	208 (76.5)	0.007^a	156 (76.5)	52 (76.5)	0.006^b	0.108	1.000
C1-	48 (15.3)	64 (23.5)		48 (23.5)	16 (23.5)			
C2+	213 (67.8)	190 (69.9)	0.655	145 (71.1)	45 (66.2)	0.655	0.777	0.449
C2-	101 (32.2)	82 (30.1)		59 (28.9)	23 (33.8)			
Genotipos								
HLA-C								
C1C1	101 (32.2)	82 (30.1)	1.000	59 (28.9)	23 (33.8)	0.496	0.777	0.449
C1C2	165 (52.5)	126 (46.3)	0.137	97 (47.5)	29 (42.6)	0.281	0.144	0.575
C2C2	48 (15.3)	64 (23.5)	0.015^c	48 (23.5)	16 (23.5)	0.021^d	0.108	1.000

N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de genotipo HLA-C. Las comparaciones fueron hechas por el Test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus.

^a, OR=1.761; 95% CI:1.184-2.621, $P=0.007$. ^b, OR=1.834; 95% CI:1.201-2.799, $P=0.006$.

^c, OR=0.586; 95% CI:0.387-0.889, $P=0.015$. ^d, OR=0.586; 95% CI:0.375-0.916, $P=0.021$.

8.3. Importancia de las combinaciones de genes KIR y sus correspondientes ligandos HLA-I en la cirrosis alcohólica

Posteriormente, se realizó un análisis de la frecuencia de combinaciones de genes KIR con su ligando conocido y considerando los ligandos HLA-C correspondiente (C1, C2 o Bw4) en cada caso (tabla 55). Para este análisis se dividió en dos grupo de genes KIR inhibidores y genes KIR activadores, se excluyeron los genes KIR constitutivos y los pseudogenes.

Cuando se evaluó KIR2DL1+/S1- en presencia y ausencia de su epítotope C2 se observó que la distribución de estas combinaciones eran similares en la población sana y enferma. Por el contrario, cuando se analizó KIR2DL2 y KIR2DL3 asociado al ligando C1+ se observó una menor frecuencia de estas combinaciones en el grupo de pacientes (83.4% vs 76.2% y 85% vs 75.9%, respectivamente), aunque esta disminución sólo fue significativa para la combinación de KIR2DL3 con C1+ (OR=1.801; 95% IC: 1.155-2.809, $P=0.010$). Resultados similares fueron obtenidos en el grupo de pacientes con cirrosis alcohólica sin infección viral asociada (OR=1.758; 95% IC: 1.092-2.831, $P=0.026$).

Igualmente se analizó también la frecuencia del gen KIR3DL1+ en presencia y ausencia de su ligando, el epítotope BW4+, pero en este caso las frecuencias fueron similares entre la población sana y la enferma ($P=0.846$).

En cuanto a los KIR activadores, se analizó la frecuencia de KIR2DS1+ en presencia y ausencia del epítotope C2, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y la población enferma. El análisis de la combinación del gen KIR2DS4 con los dos ligandos conocidos (C1+ y C2+) demostró que los pacientes portadores del ligando C1+ y KIR2DS4 disminuían respecto al grupo control (84.7% vs 76.3) y esta diferencia resultó significativa (OR=1.719; 95% IC:

1.123-2.630, $P=0.013$). Algo similar ocurría al comparar el grupo de cirrosis alcohólica sin virus con el grupo control (OR=1.714; 95% CI: 1.083-2.711, $P=0.024$). Además, la combinación de KIR2DS5 con el ligando C1+, también ha sido menos frecuente en el grupo total de pacientes con cirrosis respecto al control (84.3% vs 72.9%), aunque en este caso sin alcanzar significación estadística. Por el contrario, la combinación del ligando C2+ con KIR2DS5 aparecía aumentada en el grupo de pacientes (67.5% vs 74%), pero la diferencia observada aquí tampoco fue estadísticamente significativa.

Tabla 55. Genotipos KIR y sus ligandos HLA-I en controles sanos y pacientes con cirrosis alcohólica

		Pacientes con cirrosis alcohólica							
KIR genes	HLA-I Ligando	Controles	Pacientes						
		sanos	totales		Sin virus		Con virus		
		N=319	N=281		N=213		N=68		
		n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)	P2	P3	P4
iKIRs									
KIR2DL1+/S1-	C2+	133 (68.2)	109 (69.9)	0.817	79 (71.2)	30 (66.7)	0.609	0.860	0.570
	C2−	62 (31.8)	47 (30.1)		32 (28.8)	15 (33.3)			
KIR2DL2+	C1+	166 (83.4)	109 (76.2)	0.128	78 (73.6)	31 (83.8)	0.050	1.000	0.265
	C1−	33 (16.6)	34 (23.8)		28 (26.4)	6 (16.2)			
KIR2DL3+	C1+	233 (85)	183 (75.9)	0.010^a	139 (76.4)	44 (74.6)	0.026^c	0.057	0.861
	C1−	41 (15)	58 (24.1)		43 (23.6)	15 (25.4)			
KIR3DL1+	Bw4+	231 (76)	201 (75)	0.846	147 (73.1)	54 (80.6)	0.530	0.523	0.256
	Bw4−	73 (24)	67 (25)		54 (26.9)	13 (19.4)			
aKIRs									
KIR2DS1+	C2+	78 (67.2)	81 (70.4)	0.670	66 (71.7)	15 (65.2)	0.546	1.000	0.611
	C2−	38 (32.8)	34 (29.6)		26 (28.3)	8 (34.8)			
KIR2DS4+	C2+	204 (68)	178 (69.3)	0.784	134 (70.5)	44 (65.7)	0.616	0.773	0.538
	C2−	96 (32)	79 (30.7)		56 (29.5)	23 (34.3)			
	C1+	254 (84.7)	196 (76.3)	0.013^b	145 (76.3)	51 (76.1)	0.024^d	0.105	1.000
	C1−	46 (15.3)	61 (23.7)		45 (23.7)	16 (23.9)			
KIR2DS5+	C1+	70 (84.3)	70 (72.9)	0.072	61 (74.4)	9 (64.3)	0.127	0.129	0.517
	C1−	13 (15.7)	26 (27.1)		21 (25.6)	5 (100)			
	C2+	56 (67.5)	71 (74)	0.410	62 (75.6)	9 (64.3)	0.301	1.000	0.510
	C2-	27 (32.5)	25 (26)		20 (24.4)	5 (35.7)			

N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de ligando para un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus. ^a OR =1.801; 95% IC: 1.155-2.809, $P=0.010$; ^b OR=1.719; 95% IC: 1.123-2.630, $P=0.013$; ^c OR= 1.758; 95% IC: 1.092-2.831, $P=0.026$; ^d OR=1.714; 95% CI: 1.083-2.711, $P=0.024$.

8.4. Combinaciones de genes KIR y genotipos HLA-C en pacientes con cirrosis alcohólica y controles sanos

La combinación de genes KIR con los distintos genotipos HLA-C fue también analizada en pacientes y controles (tabla 56). En principio, se examinó la presencia de genes KIR con cada genotipo HLA-C en la población control y la enferma, lo que permitió observar que existía un predominio de individuos sanos y enfermos KIR2DL1+/S1- con el genotipo HLA C1C2, seguido por su combinación con el genotipo C1C1. La combinación KIR2DL1+/S1- con el genotipo C2C2 fue la menos frecuente en ambos grupos de individuos analizados. No obstante, en ningún caso las diferencias observadas alcanzaron significación estadística. Tampoco se observaron cambios significativos para estas combinaciones cuando se comparó la cirrosis alcohólica asociada a infección viral con la de pacientes sin infección viral asociada.

Cuando se analizó la combinación de KIR2DL2 con los distintos genotipos HLA-C, se observó una distribución similar de la población control respecto a la población enferma. En cambio, se observó un aumento estadísticamente significativo de la combinación de KIR2DL2/C1C1 en el grupo de pacientes con cirrosis alcohólica viral respecto a la no viral (45.9% vs 24.5%, respectivamente) (OR=0.382; 95% IC: 0.175-0.837, $P=0.021$).

El análisis de la presencia de KIR2DL3 en individuos con distintos genotipos HLA-C mostró la existencia de un aumento del genotipo C2C2 en el grupo de pacientes (24.1%) respecto a la población control (15%), aumento que resultó estadísticamente significativo (OR=0.555; 95% IC: 0.356-0.866, $P=0.010$). Una distribución similar de estas combinaciones fue observada cuando se comparó la población de cirrosis sin virus con la población control (OR=0.569; 95% IC: 0.353-0.916, $P=0.026$). También se

observó un aumento en la población de cirrosis alcohólica asociada a virus, pero en este caso la diferencia no llegó a ser significativa ($P=0.057$).

En segundo lugar, se analizaron las combinaciones de genotipos aKIR con los distintos HLA-C (tabla 56). Así se observó que los individuos portadores del gen KIR2DS1 combinados con el genotipo C2C2 eran más frecuentes en el grupo total de pacientes respecto al de controles (16.4%vs 27%), diferencia que quedó muy próxima a la significación ($P=0.056$). Resultados similares se observaron al comparar la población de pacientes con infección viral asociada con los controles (16.4% vs 34.8%, $P= 0.079$).

El análisis de KIR2DS4 en los diferentes genotipos HLA-C mostró un aumento significativo de la frecuencia de la asociación de KIR1DS4 con el genotipo C2C2 en la población total de enfermos (15.3% vs 23.7%; OR= 0.582; 95% IC: 0.380-0.891, $P=0.013$). Diferencias similares fueron observadas también cuando se comparó la población de cirrosis alcohólica sin infección viral con la población control (15.3% vs 23.7%, respectivamente; OR=0.584; 95% IC: 0.369-0.923, $P= 0.024$).

Finalmente la presencia de KIR2DS5 fue también evaluada en los diferentes genotipos HLA-C, pues aunque KIR2DS5 aún no tiene ligando establecido, en algunas patologías se ha descrito la coexistencia de KIR2DS5 con algunos genotipos HLA-C. Este análisis permitió demostrar que la frecuencia de KIR2DS5+/C2C2 aparecía aumentada en la población enferma respecto a la población control (15.7% vs 27.1%), aunque la diferencia solo rozó la significación estadística ($P=0.072$).

Tabla 56. Frecuencia de genes KIR y genotipos HLA-C en controles sanos y en pacientes con cirrosis alcohólica

		Pacientes con cirrosis alcohólica							
KIR genes	HLA-C Genotipo	Controles	Pacientes		Sin virus N=213	Con virus N=68	P2	P3	P4
		sanos N=319	totales N=281						
		n (%)	n (%)	P1	n (%)	n (%)			
iKIRs									
KIR2DL1+/S1-	C1C1	62 (31.8)	47 (30.1)	0.817	32 (28.8)	15 (33.3)	0.609	0.860	0.570
	C1C2	104 (53.3)	76 (48.7)	0.393	54 (48.6)	22 (48.9)	0.476	0.622	1.000
	C2C2	29 (14.9)	33 (21.2)	0.159	25 (22.5)	8 (17.8)	0.118	0.648	0.666
KIR2DL2+	C1C1	62 (31.2)	43 (30.1)	0.905	26 (24.5)	17 (45.9)	0.236	0.090	0.021^a
	C1C2	104 (52.3)	66 (46.2)	0.275	52 (49.1)	14 (37.8)	0.631	0.151	0.257
	C2C2	33 (16.6)	34 (23.8)	0.128	28 (26.4)	6 (16.2)	0.050	1.000	0.265
KIR2DL3+	C1C1	87 (31.8)	72 (29.9)	0.702	54 (29.7)	18 (30.5)	0.680	1.000	1.000
	C1C2	146 (53.3)	111 (46.1)	0.112	85 (46.7)	26 (44.1)	0.181	0.251	0.765
	C2C2	41 (15.0)	58 (24.1)	0.010^b	43 (23.6)	15 (25.4)	0.026^c	0.057	0.861
aKIRs									
KIR2DS1+	C1C1	38 (32.8)	34 (29.6)	0.786	26 (28.3)	8 (34.8)	0.546	1.000	0.611
	C1C2	59 (50.9)	50 (43.5)	0.293	43 (46.7)	7 (30.4)	0.579	0.109	0.239
	C2C2	19 (16.4)	31 (27.0)	0.056	23 (25.0)	8 (34.8)	0.164	0.079	0.431
KIR2DS4+	C1C1	96 (32.0)	79 (30.7)	0.784	56 (29.5)	23 (34.3)	0.616	0.773	0.538
	C1C2	158 (52.7)	117 (45.5)	0.106	89 (46.8)	28 (41.8)	0.228	0.137	0.568
	C2C2	46 (15.3)	61 (23.7)	0.013^d	45 (23.7)	16 (23.9)	0.024^e	0.105	1.000
KIR2DS5+	C1C1	27 (32.5)	25 (26.0)	0.410	20 (24.4)	5 (35.7)	0.301	1.000	0.510
	C1C2	43 (51.8)	45 (46.9)	0.551	41 (50.0)	4 (28.6)	0.877	0.150	0.159
	C2C2	13 (15.7)	26 (27.1)	0.072	21 (25.6)	5 (35.7)	0.127	0.129	0.517

N, número total de individuos; n, número de individuos con presencia o ausencia de un gen KIR. Las comparaciones fueron hechas por el test exacto de Fisher de dos colas. Cada valor de P se obtuvo al comparar cada ligando con el resto de ligandos para ese gen concreto. P1, valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica totales con los controles sanos; P2 y P3; valor de P obtenido al comparar a los pacientes con cirrosis alcohólica sin y con infección viral asociada con los controles sanos, respectivamente; P4, valor de P obtenido al comparar cirrosis alcohólica sin infección viral con cirrosis alcohólica asociada a virus. ^a OR=0.382; 95% IC: 0.175-0.837, P=0.021; ^b OR =0.555; 95% IC: 0.356-0.866, P=0.010; ^c OR=0.569; 95% IC: 0.353-0.916, P=0.026; ^d OR= 0.582; 95% IC: 0.380-0.891, P=0.013; ^e OR=0.584; 95% IC: 0.369-0.923, P=0.024.

DISCUSIÓN

En el capítulo 1 se realizó un estudio retrospectivo, se estudió una gran cohorte de pacientes con cirrosis alcohólica sometidos a trasplante hepático a lo largo de 25 años en el sureste de España, analizando sus características sociodemográficas, bioquímicas, principales complicaciones clínicas pretrasplante y postrasplante, y tasas de supervivencia a corto y largo plazo, ya que un mejor conocimiento del espectro de la enfermedad hepática alcohólica podría resultar beneficioso para una detección temprana y para la prevención de la hepatopatía alcohólica antes de que sus efectos repercutan en la salud del paciente.

En nuestra cohorte de pacientes, la cirrosis hepática alcohólica es la principal causa de trasplante hepático (38,4%), junto con la cirrosis viral y el hepatocarcinoma, que representan más del 72,6% de todos los trasplantes de hígado. Datos similares se obtuvieron de diferentes grupos étnicos en la población británica (Douds y col 2003). Por el contrario, nuestros resultados sobre la frecuencia de cirrosis alcohólica como indicación a trasplante hepático son ligeramente superiores a los datos recogidos en el resto de Europa (33%) y en España (30%), donde la cirrosis alcohólica es la segunda indicación más frecuente de trasplante hepático, detrás de la cirrosis viral en el mundo occidental y otras poblaciones (RETH , 2013; Xie y col, 2013; Adam y col, 2012; Burra y col, 2010, Lucey y col, 2009). Adam y col., 2012, observaron un aumento de frecuencia en dos de las indicaciones a trasplante hepático en Europa en los últimos 10 años, la cirrosis alcohólica y el carcinoma hepatocelular. Según la UNOS 2012, en EEUU la cirrosis hepática alcohólica es la tercera causa más frecuente de trasplante hepático, representando un 17.2% de todos los trasplantes hepáticos de EEUU en 2012.

En cuanto a la combinación de cirrosis alcohólica e infección viral, Adam y col., 2012, observaron que el 3% de los trasplantes por cirrosis hepática eran de causa mixta (alcohol e infección viral), de los cuales el 2% fue por VHC, mientras que en nuestra

población el porcentaje fue mayor, con un 9.06% de pacientes trasplantados por cirrosis hepática alcohólica asociada a virus, de los cuales el 5.8% fue por VHC.

Existen datos en España sobre el trasplante hepático que indican una frecuencia en las indicaciones a trasplante hepático similar a nuestros resultados. Franco y col., 2013, analizaron los pacientes con trasplante hepático en Andalucía, y observaron una frecuencia de cirrosis entre el año 2000 y 2010 del 45.5%, seguida de la cirrosis por VHC, con un 20.4% de frecuencia, y de cáncer de hígado con un 11.8%. Así mismo, Rubín y col., 2013, observaron resultados algo diferentes, siendo la cirrosis por VHC la indicación principal en el Hospital la Fe de Valencia, con un 44% de frecuencia, seguida de la cirrosis alcohólica con un 24%, y del CHC con una frecuencia del 12.5%, excepto la asociación de cirrosis alcohólica y VHC (10%), que fue muy similar a la de nuestros resultados. Esta tendencia también se observa en los datos recogidos al sur de Brasil, por Mattos y col., 2014, siendo la cirrosis por VHC la indicación más frecuente (51.40%), seguida de la cirrosis alcohólica (18.10%), la cirrosis por VHB (5.60%) y el CHC (2.70%). En esta población, la cirrosis alcohólica asociada a virus tuvo una mayor representación que en nuestra población (13.90%).

En nuestro estudio, la edad media de los pacientes totales fue de 51 años. Al analizar la evolución de la edad a lo largo de los años se observa que la edad media ha ido aumentando. La edad de los pacientes trasplantados a nivel nacional también ha sufrido variaciones, y aunque el grupo de edad comprendido entre 40-59 años sigue siendo el más frecuente se ha observado una ligera disminución de pacientes de ese grupo a expensas de pacientes más mayores (60 años o más) (Memoria de Trasplante hepático, RETH 2013), por lo que esto explicaría nuestros resultados.

El grupo de pacientes con cirrosis alcohólica tenía una edad media de 53 años, sin existir diferencias de edad entre géneros. En otros estudios de diferentes poblaciones y

periodos de tiempo la edad media fue similar (Ray y col., 2014; Aguilera y col., 2009; Pfitzmann y col 2007; Amarapurkar y col, 1988). También cabe mencionar, cómo la hepatitis fulminante es más frecuente en pacientes jóvenes (36,7 años).

En cuanto a las diferencias de género, la cirrosis alcohólica es la principal indicación de trasplante hepático en los hombres (50.3%), mientras que la cirrosis viral (32,9%) es la principal indicación en mujeres, seguida de la cirrosis autoinmune (18,1%), y en tercera posición, la cirrosis alcohólica con un 11,5%. Nuestros resultados parecen sugerir que el consumo de alcohol es menor en las mujeres, aunque esta información no ha sido posible obtener en este estudio. Sánchez Pardo, 2002 observó que los hombres españoles habitualmente beben más que las mujeres, y que la proporción de bebedores y de alcohólicos es mucho mayor entre hombres, a pesar de que el número de mujeres bebedores está creciendo en los últimos años. Otros estudios también podrían explicar esta baja incidencia de cirrosis alcohólica como indicación de trasplante hepático en mujeres en nuestra población (Amarapurkar y col., 1988; Becker U y col., 1996; Morgan y col., 1977). Sin embargo, Ray y col., 2014 observaron que la edad y el sexo no parece estar correlacionada con la cantidad y la duración del consumo de alcohol en la población de la India. Por lo tanto, otra posible explicación es que las mujeres son más propensas a sufrir los efectos hepatotóxicos del alcohol en comparación a los hombres, debido a las diferencias de grasa corporal y de ADH gástrica, por lo que pueden desarrollar cirrosis hepática con una menor ingesta de alcohol (Norberg y col., 2003, Frezza y col., 1990).

Al igual que nuestros resultados muestran diferencias en la frecuencia de cirrosis alcohólica entre los géneros, hay que señalar que la presencia de infecciones virales concomitantes con cirrosis alcohólica, también es algo diferente en hombres y mujeres (22,8% y 30,0% respectivamente), pero no ocurre así en el caso del VHC, que es

similar en hombres y mujeres (64.3% y 66.7, respectivamente), por lo que este aumento podría ser debido a una sobrerrepresentación de CMV en las mujeres. La relación concomitante (alcohol e infección por VHC), que actúa de forma sinérgica causando una progresión acelerada de la fibrosis (Singal y col., 2007), puede explicar en parte el aumento del número de trasplantes de hígado realizados por cirrosis alcohólica en nuestra población en comparación al RETH (Adam y col., 2012),

Por otra parte, el análisis de las principales indicaciones de trasplante hepático muestra como la cirrosis autoinmune y la hepatitis fulminante son significativamente más frecuentes en las mujeres, dato que también han corroborado otros estudios (Van Gerven y col., 2014; Germani y col., 2012). El mecanismo exacto de las diferencias de género en la enfermedad hepática autoinmune y la autoinmunidad en general no se conoce, sin embargo, tanto la inmunogenética como la influencia hormonal juegan un papel complejo (Manns y col., 2010, Whitacre, 2001).

Nuestros datos muestran cómo la cirrosis alcohólica como indicación de trasplante hepático ha sufrido fluctuaciones a lo largo de los 25 años estudiados. Se observó que la frecuencia mínima de pacientes con cirrosis alcohólica trasplantados fue en el año 2001. En los años siguientes hubo un aumento hasta 2009, y posteriormente su frecuencia volvió a caer. Tal vez, este descenso se debe al desarrollo de mejores tratamientos, mejoras en la detección temprana de la enfermedad, lo que permite en algunos casos revertir y disminuir parcialmente el grado de fibrosis hepática con el cese del consumo de alcohol. Además, en la última década en España, se ha producido un aumento de los programas de intervención de alcohol y un endurecimiento en las sanciones por consumo de alcohol y venta en jóvenes, tanto en política nacional y regional, cuya eficacia se confirmará con la disminución de la hepatopatía alcohólica en el futuro (Moral Jiménez y col., 2009).

En general, nuestra tasa de supervivencia global a corto plazo es menor que la registrada por el registro Europeo y otros estudios, pero a largo plazo la supervivencia es similar (ELTR 2013; Chen y col., 2010; Aguilera y col., 2009). Esto podría explicarse por una mayor mortalidad y complicaciones en nuestro hospital que podrían estar relacionadas con aspectos derivados del postoperatorio inmediato y de la evolución en los meses posteriores.

El análisis de la supervivencia de nuestros pacientes muestra como la cirrosis autoinmune y la cirrosis alcohólica tienen las mejores supervivencias, tanto a corto como a largo plazo, pero se observa una disminución de la supervivencia en pacientes con cirrosis alcohólica asociada a infección viral, dato que se corrobora con los observados por Lucey y col., 2009. Además, en el periodo pretrasplante, autores como Singal y col., 2012, ya observaron que los pacientes con hepatitis alcohólica e infección por VHC concomitante presentaban una mayor mortalidad en comparación a los pacientes con hepatitis alcohólica sin infección por VHC. Una de las posibles razones podría ser la precaución de los médicos y gastroenterólogos en el uso de corticosteroides para el tratamiento de la hepatitis alcohólica en presencia de infección por VHC (Singal y col., 2011).

Se ha de tener en cuenta que la supervivencia es menor en la cirrosis viral exclusivamente, en comparación a la cirrosis alcohólica asociada a virus (Aguilera y col., 2009), dato curioso que se corrobora en nuestros resultados, y que quizá podría explicarse por un mayor uso de antivirales en aquellos que asocian cirrosis alcohólica con virus.

En la cirrosis autoinmune, nuestras tasas de supervivencia a medio y largo plazo son similares a otros estudios (ELTR 2013; Germani y col., 2012).

En general, nuestros datos corroboran las tasas de supervivencia postrasplante de los pacientes con cirrosis alcohólica de diferentes partes del mundo, que fueron del 81%-96%, 78%-86%, y del 73%-88% a 1, 3, y 5 años respectivamente (Singal y col., 2013, Bachir y col., 2012; Burra y col., 2010; Pfitzmann y col., 2007). Dumortier y col., 2007, registraron una tasa de supervivencia similar, mayor del 70% a los 10 años después del trasplante. Por el contrario, otros estudios registraron una tasa de supervivencia significativamente menor a los 10 años en aquellos pacientes que sufrieron una recaída en el consumo de alcohol (45% vs 85,5%) (Iruzubieta y col., 2013; Cuadrado y col., 2005). Nuestros datos de supervivencia a 10 años muestran tasas de supervivencia intermedios (69,6%), tal vez, esto podría ser debido a que nuestros pacientes no se han clasificado según la recaída en el consumo de alcohol.

La enfermedad hepática alcohólica recurrente fue la causa de muerte en pacientes que volvieron a beber en exceso. Los pacientes sin un consumo de abuso o abstinentes murieron debido principalmente a las infecciones, tumores malignos, o enfermedad cardiovascular (Pfitzmann y col., 2007). Sin embargo, no ha sido posible obtener en nuestro estudio los datos sobre el tipo y cantidad de alcohol consumido por el paciente previamente al trasplante, así como los de recaída de consumo de alcohol. En cualquier caso, los buenos resultados sobre la supervivencia del injerto y de los pacientes trasplantados por cirrosis alcohólica, han animado a los médicos y a las comunidades a aceptar y reafirmar la cirrosis hepática alcohólica como una indicación excelente de trasplante hepático (Singal y col., 2013; Starzl y col., 1988).

La cirrosis alcohólica es la principal indicación de trasplante hepático, por la buena evolución postrasplante en términos de incidencia de rechazo del injerto y en base a la alta supervivencia experimentada por los pacientes que se observa en nuestra serie. Aunque la frecuencia de cirrosis hepática alcohólica está disminuyendo en la

última década, siguen siendo necesarias nuevas estrategias y mayores esfuerzos por parte de la política de salud pública, para detectar, tratar y reducir la frecuencia de cirrosis alcohólica en nuestra población, ya que la cirrosis alcohólica es una enfermedad que se puede prevenir controlando el abuso de alcohol. Sería necesario realizar estudios en el futuro, teniendo en cuenta el tipo y la cantidad de alcohol ingerido por el paciente previamente al trasplante hepático, así como la edad de inicio del consumo de alcohol y la recaída en la ingesta de alcohol en los pacientes sometidos a trasplante hepático.

En el capítulo 2 se realizó un estudio retrospectivo genético entre individuos sanos y pacientes varones con cirrosis alcohólica con y sin infección viral asociada sometidos a trasplante hepático. En ambos grupos de pacientes, se comparó el repertorio de genes KIR y genes HLA-C, y sus posibles combinaciones en función de la especificidad ligando receptor, todo ello con la finalidad de observar si esta familia de genes poligénicos guardan alguna relación con el riesgo de desarrollar cirrosis alcohólica.

Para realizar el análisis genético de este segundo capítulo, hemos descartado a las mujeres con cirrosis alcohólica de nuestra cohorte inicial, por lo tanto el análisis se ha limitado a un grupo bien definido de varones españoles con cirrosis alcohólica en estadios terminales de su enfermedad incluidos en lista de espera para el trasplante hepático. Esto nos permite comparar genéticamente un conjunto de hombres españoles con cirrosis alcohólica (n=281) con una población masculina caucasoide sana (n=319) con edades medias similares.

La fibrosis hepática se caracteriza por la aparición de tejido cicatricial, resultado de la inflamación del hígado y muerte de células hepáticas. La fibrosis hepática ocurre cuando el tejido cicatricial excesivo se acumula más rápido de lo que se puede descomponer. Se ha observado como infecciones crónicas por virus de hepatitis o el

consumo excesivo de alcohol, así como las toxinas u otros factores pueden provocar fibrosis hepática (Peter MG y col., 2002; Safdar K y col., 2004; Bhattacharya R y col., 2003). Además, se ha observado como el consumo crónico de alcohol es capaz de acelerar los procesos de fibrosis hepática en pacientes con hepatitis viral (Purohit V y col., 2006).

La fibrosis hepática, ha sido tradicionalmente considerada un proceso "pasivo" e irreversible, tras el colapso del parénquima hepático y su reemplazo por un tejido rico en colágeno. Sin embargo, numerosas observaciones clínicas y estudios experimentales indican que este concepto no es correcto (Song Z y col., 2004; Lieber CS. 2004; Szabo G. 1999).

Se ha observado que el consumo crónico de alcohol produce alteraciones de índole diversa en el sistema inmune, y esto propicia múltiples consecuencias patológicas. Se han observado efectos tanto en la respuesta inmune específica humoral y celular (Williams R y col., 2006; O'Shea RS y col., 2010; Jeong WJ y col., 2008) como en la respuesta inespecífica (innata); entre estos últimos, destacan los trastornos en el aclaramiento de antígenos por parte de los macrófagos alveolares y las células de Kupffer (Liu YK y col., 1979) o una menor actividad citotóxica vinculada a las células natural killer (NK) (Laso FJ y col., 1997).

Todo esto conlleva al establecimiento de un estado de inmunodeficiencia, con el consiguiente riesgo elevado de infecciones graves (Szabo G y col., 1999). Estas observaciones se confirman con nuestros datos ya que se observan altos porcentajes de infecciones virales asociadas en nuestra población de enfermos con cirrosis alcohólica, destacando el alto porcentaje de virus de la hepatitis C (VHC).

Por otra parte, estudios actuales también ponen de relevancia la posible contribución de fenómenos propios de un estado de activación del sistema inmune

(Song Z y col., 2004; Lieber CS y col., 2004) en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica.

Se ha constatado que en la ingesta crónica de alcohol se activan la respuesta inflamatoria hepática (Tilg H y col., 2000), los monocitos de sangre periférica (Hanck C y col., 2001) y ciertas subpoblaciones citotóxicas linfoides T (Song K y col., 2001; Jerrells TR y col., 2002) y NK (Laso FJ y col., 1997).

A su vez, la activación del sistema inmune podría determinar alteraciones en la producción de determinadas citocinas que desempeñan un papel fundamental en las respuestas inmune específica e inflamatoria, en la angiogénesis, en el crecimiento y la diferenciación celulares.

Así, en el ámbito del alcoholismo los hallazgos iniciales más destacados fueron la detección en pacientes con enfermedad hepática alcohólica de concentraciones séricas elevadas de citocinas proinflamatorias (interleucina IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Khoruts A y col., 1991; Hill DB y col., 1992) y de la quimiocina IL-8 (Hill DB y col., 1992), así como un incremento de su síntesis en los monocitos de sangre periférica (McClain CJ y col., 1989; McClain CJ y col., 1993). A este respecto, numerosos estudios están aportando avances significativos en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad hepática alcohólica (Song Z y col., 2004; Tilg H y col., 2000; McClain CJ y col., 1999; Diehl AM y col., 1999; Neuman MG y col., 2001).

Por otra parte, también se ha visto como el estrés oxidativo actúa como un mecanismo clave en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica asociado con el alcoholismo (desequilibrio entre las concentraciones intracelulares de radicales libres de oxígeno y factores antioxidantes) (Lieber CS y col., 2004; Lieber CS y col., 2001; Sun AY y col., 2001), también hay que tener en cuenta la trascendencia que tiene en esas circunstancias en la respuesta inmune.

Por lo tanto el estrés oxidativo generado al metabolizarse el etanol en el hepatocito no sólo es un factor promotor por sí mismo de necrosis y apoptosis, sino que, además, los radicales libres del oxígeno liberados en este proceso activan en las células de Kupffer la producción de NFκB, aumentando en éstas la síntesis de TNFα y otras citocinas proinflamatorias (Lands WEM y col., 1995); en ese sentido, es interesante señalar que la deficiencia del antioxidante S-adenosil-L-metionina (SAME) se asocia también con una mayor secreción de TNF-α (Chawla RK y col., 1996; Roman J y col., 1999) . Por otro lado, la endotoxina propicia que las células de Kupffer formen radicales libres del oxígeno, lo que contribuye a incrementar más aún la producción de las citocinas mencionadas.

En la figura 83, se pueden observar las estrechas interacciones entre las citocinas proinflamatorias y el estrés oxidativo en la patogenia de la enfermedad hepática alcohólica.

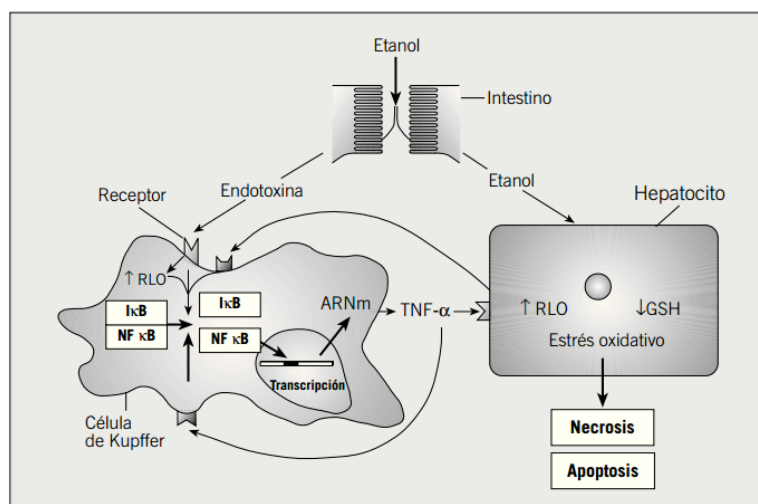


Figura. 83. Intervención del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en el desarrollo de apoptosis y necrosis de los hepatocitos en la enfermedad hepática alcohólica. Interrelaciones entre TNF-α y estrés oxidativo. GSH: glutathión; IκB: inhibidor del factor nuclear kappa B; NFκB: factor nuclear kappa B; RLO: radicales libres de oxígeno (Extraída de Laso FJ y col., 2005).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la mayor sensibilidad y vulnerabilidad de los hepatocitos a los efectos lesivos del TNF- α secretado por las células de Kupffer. Se observa una depleción de antioxidantes, como el glutatión intramitocondrial (García-Ruiz C y col., 1994), protector de la apoptosis de los hepatocitos (Fernández-Checa JC y col., 1997); el acceso al citoplasma de citocromo C, activador de caspasas de la vía intrínseca inductora de apoptosis, como consecuencia de un aumento de la permeabilidad de la membrana de la mitocondria (Higuchi H y col., 2001); o una menor producción en el interior del hepatocito de NF κ B (Zeldin G y col., 1996) que, como ya se ha indicado, puede actuar como factor de transcripción para la síntesis de determinadas proteínas antiapoptóticas.

Se piensa que después de una lesión hepática crónica, el daño de los hepatocitos y la activación de las células de Kupffer conducen a la activación de células estrelladas hepáticas (CEH). Las células hepáticas estrelladas activadas producen una gran cantidad de proteínas de matriz extracelular (ECM), que se acumulan dentro del espacio subendotelial de Dissé y conducen a fibrosis hepática. Muchos tipos celulares (miofibroastos, células progenitoras de la médula ósea, y hepatocitos) deben también estar involucradas en la producción de proteínas de la matriz extracelular y colágeno, pero juegan un papel menos importante que el jugado por las CHE (Friedman SL, y col., 2006; Iredale JP y col., 2007; Bataller R y col., 2005).

Por otra parte, se ha observado como el consumo crónico de alcohol reduce el porcentaje y el número de células Natural Killer (NK) en ratones y en seres humanos aunque el mecanismo subyacente para estos cambios todavía no es entendido en su totalidad.

Recientemente se ha encontrado que el consumo crónico de alcohol inhibe la liberación de células NK de la médula ósea y que esto está asociado con una

disminución de las células NK esplénicas. Por lo tanto, el número de las células NK periféricas va a estar estrechamente controladas por la proliferación homeostática. No se sabe si este mecanismo se inicia en respuesta a la reducción de las células NK esplénicas, o si es así, por qué en el estado estacionario los niveles de células NK no se restauran (Hui Zhang and Gary G, 2009) (figura 84).

Hui Zhang and Gary G en 2009, observaron como el consumo crónico de alcohol compromete la liberación de células NK de la médula ósea y aumenta la apoptosis de las células NK en el bazo, que se asocia con la disminución de las células IL-15+ esplénicas, especialmente las células IL-15 + CD11chi.

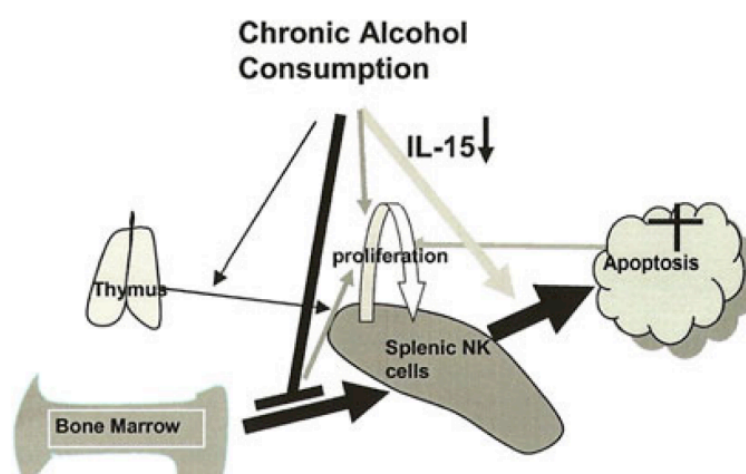


Figura 84. Esquema representativo de cómo el consumo crónico de alcohol disminuye las células NK esplénicas (Extraída de Hui Zhang and Gary G, 2009).

Amplificación del alcohol del efecto pro-fibrogénico de las células de Kupffer

Actualmente, existe una creciente evidencia de que el consumo crónico de alcohol conduce a la fibrosis hepática mediante la regulación positiva de los efectos pro-fibrogénicos de las células de Kupffer (figura 85). Está bien establecido que el consumo crónico de alcohol aumenta la fuga de endotoxina intestinal en humanos y roedores, lo

que conduce a la endotoxemia, y esto es lo que probablemente contribuye al desarrollo de la hepatitis alcohólica, fibrosis y cirrosis (Parlesak A y col., 2000; Stern M y col., 1986).

La concentración de lipopolisacárido (LPS) se encontró en niveles elevados en pacientes alcohólicos y además, el consumo crónico de alcohol aumenta la expresión de CD14 en las células de Kupffer, aumentando aún más la sensibilidad de las células de Kupffer a LPS (Enomoto N y col., 2001; Enomoto N y col., 1998; Wheeler MD y col., 2003).

El consumo crónico de alcohol también mejora la capacidad de respuesta de las células de Kupffer a las células apoptóticas, lo que da lugar a la producción de citocinas más proinflamatorias (McVicker BL y col., 2007).

En conjunto, el consumo crónico de etanol conduce a la elevación de los niveles de LPS hepáticos, que se dirigen a receptores CD14/TLR4 que se elevan después del consumo de etanol, dando lugar a la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL6 y TGF- β 1, y posterior activación de CHes y fibrosis hepática.

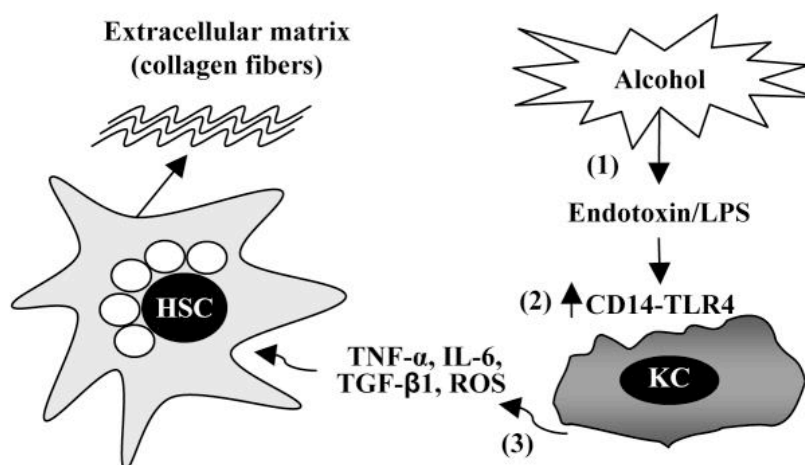


Figura 85. El alcohol amplifica los efectos pro-fibrogénicos de las células de Kupffer. El consumo de alcohol permeabiliza el intestino, dando como resultado niveles elevados de endotoxina hepática, que es seguido por la activación de células de Kupffer. Las células activadas de Kupffer producen una variedad de citoquinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios tales como TNF- α , IL-6, TGF- β 1 y especies reactivas del oxígeno (ROS), que activan entonces CESs, conduciendo a la producción de matriz extracelular (fibras de colágeno) e hígado fibrosis. El consumo crónico de alcohol también aumenta la sensibilidad de las células de Kupffer a la endotoxina mediante la regulación positiva de la expresión de CD14 (Enomoto N y col., 2001; Enomoto N y col., 1998; Wheeler MD y col., 2003).

Por otra parte también se ha observado como el etanol ha sido reconocido por mucho tiempo como una sustancia inmunosupresora, produciendo la supresión de la actividad de las células NK (Collier SD y col., 2000; Boyadjieva N y col., 2001; Boyadjieva N y col., 2004; Pan HN y col., 2006).

Más específicamente, las células NK hepáticas pueden estar implicadas en la inhibición y regeneración de la fibrosis hepática (Radaeva S y col., 2006, Jeong WI y col., 2006, Chen Y y col., 2007, Hines IN y col. R y col., 2004, Melhem A y col., 2006)

(Radaeva S y col., 2006, Jeong WI y col., 2006, Melhem A y col., 2006), principalmente debido al contacto NK con células sanas. Las señales receptoras inhibitoras son dominantes sobre la activación de las señales receptoras, contribuyendo así a prevenir el auto-ataque y mejorar la auto-tolerancia a NK (Long EO y col., 1999; George TC y col., 1999).

Estudios recientes realizados por Won-IL Jeong and Bin Gao en 2008, observaron que la inhibición del alcohol sobre las células NK/IFN- γ podría ser un importante mecanismo que contribuye a la fibrosis hepática inducida por el alcohol y aceleración de la fibrosis hepática (figura 86). En primer lugar, el consumo crónico de etanol disminuye e inhibe la acumulación del número de células NK en el hígado (Pan HN y col., 2006; Jeong WIPO y col., 2007)

Won-IL Jeong and Bin Gao en 2008, también observaron que el consumo crónico de etanol inhibe la capacidad citotóxica de las células NK sobre las células hepáticas estrelladas activadas (CHE) a través de la regulación negativa de la expresión de NKG2D, TRAIL, granzima, perforina e IFN- γ en células NK (Pan HN y col., 2006; Jeong WIPO y col., 2007).

También se ha observado como un consumo de alcohol estimula las CHE para producir TGF- β que puede inhibir las funciones de las células NK (Jeong WIPO y col., 2007). Y por último también se ha visto como el alcohol elimina el efecto anti-fibrótico del poli I:C y del IFN- γ mediante la inhibición de STAT1 lo que induce la apoptosis y la parada del ciclo celular de la CHE (NJeong WI y col., 2008). Se ha demostrado que el tratamiento in vitro con IFN- γ y STAT1 inhibe la fibrosis hepática en ratones sometidos a control de alimentación, pero no se observó este efecto en ratones alimentados con etanol (NJeong WI y col., 2008).

Otros estudios sugieren que la inhibición del etanol de la activación de IFN- γ de STAT1 está mediada por inducción de la expresión de SOCS1 y la estimulación de hepatocitos para producir ROS, que posteriormente inhibe la señalización de IFN- γ / STAT1 en CHE (Jeong WIPO y col., 2007).

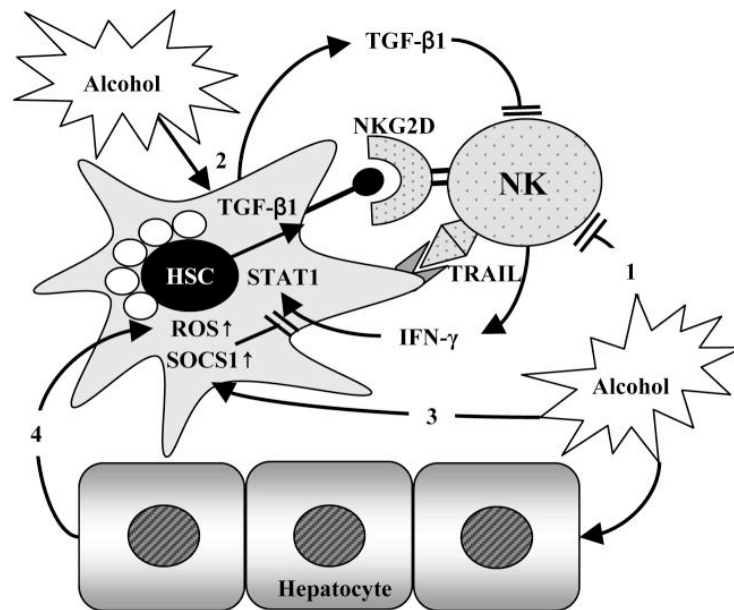


Figura 86. El alcohol inhibe los efectos anti-fibrogénicos de NK / IFN- γ . El alcohol inhibe los efectos antifibrogénicos de las células NK a través de múltiples mecanismos incluyendo (1) el alcohol disminuye el número de células NK y la citotoxicidad de las células NK frente a las CHE; (2) alcohol estimula CHE para producir TGF- β 1, seguido por la inhibición de la muerte de células NK de CHEs; (3) el alcohol induce la expresión del supresor de la proteína de señalización de citoquinas 1 (SOCS1) en CHEs, seguido por la inhibición de la señalización de IFN- γ en CHEs; (4) etanol estimula los hepatocitos para producir estrés oxidativo, que luego inhibe la señalización de IFN- γ en CHE. (Figura modificada de Jeong WIPO y col., 2007).

Jeong WI y col., 2006 estudiaron el papel entre las células estrelladas hepáticas y la célula NK en fibrosis hepática y cirrosis (figura 87). Observaron como las interacciones entre las células estrelladas hepáticas (CHE) y los estos subconjuntos de células inmunes han surgido como determinantes importantes de la progresión y la regresión de la fibrosis hepática.

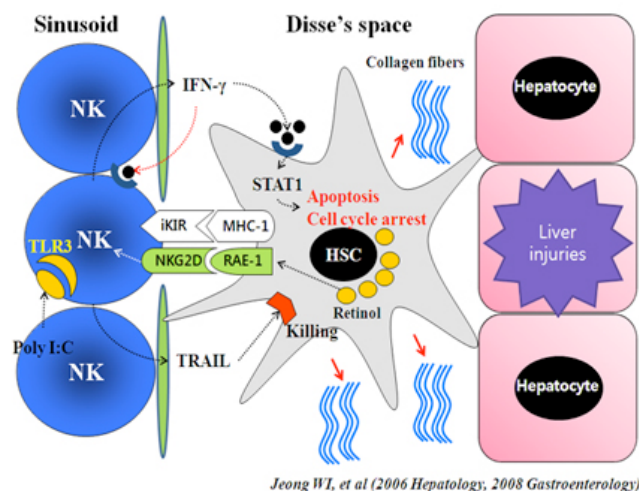


Figura 87. Esquema del proceso de progresión de la fibrosis hepática mediante la inhibición de la apoptosis de células NK por parte de las CEH y la supresión de la señalización de IFN- γ en HSCs. (Figura extraída de Jeong WI y col., 2006).

Las células asesinas naturales (NK) tienen una actividad antifibrótica mediante la eliminación de CHE activadas productoras de fibras colágenas. Las células hepáticas estrelladas (CHE) son las encargadas del almacenaje del 75% del retinol del organismo. Durante la activación de la célula estrellada, el retinol es metabolizado en retinal a través de la alcohol deshidrogenasa y finalmente metabolizada a ácido retinoico (AR). Este ácido retinoico induce la expresión de la proteína RAE-1 en la superficie de la célula estrellada, el cual es ligando activador para las células NK. Como respuesta la

célula NK produce la enzima TRAIL la cual se une a receptores específicos TRAILR en la célula estrellada induciendo su muerte.

Estudios in vitro han demostrado el efecto antifibrótico de las células NK solamente en el inicio de la enfermedad hepática caracterizada por la presencia de células estrelladas hepáticas activadas tempranamente (CHE).

Por otro lado también se ha observado que cuando se produce una lesión hepática, la expresión en la superficie de receptores (aKIR /iKIR) y su relación aumentan significativamente, mientras que la expresión de MHC-I por las CHE activadas disminuye. Los ligandos naturales de las moléculas MHC-I se encuentran ubicados en la superficie de la célula NK y suelen ser genes KIR inhibidores (iKIR), su unión a MHC-I hace que la célula NK produzca IFN- γ y desencadena la apoptosis de la célula estrellada y este fenómeno es el que permite la acción antifibrótica de las células NK (Jeong WI y col., 2006).

La unión de IFN- γ a la superficie de la célula estrellada se ha visto como es capaz de activar a STAT1, el cual es un importante regulador negativo en la fibrosis hepática ya que produce la parada en ciclo de la célula estrellada conduciéndola hacia la apoptosis. Se ha observado como la disrupción del gen STAT1 acelera la fibrosis hepática y la proliferación de células estrelladas hepáticas (CHE) en un modelo in vivo de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄). Por lo tanto, STAT1 podría ser considerada una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la fibrosis hepática.

En condiciones normales, en ausencia de enfermedad fibrótica, se ha observado que las células NK son inhibidas por la interacción de su iKIR y MHC-I presente en CHE normal lo cual impide la muerte de CHE por la célula NK (Melhem A y col., 2006). Este tipo de inhibición se elimina cuando se activan CHEs debido a la regulación

negativa de la expresión de MHC de clase I, haciendo que las CHE sean susceptibles de muerte.

Por esta razón, en este estudio se han analizado los genes KIR/HLA-C en pacientes con cirrosis alcohólica ya que la inmunidad innata está implicada en el control del desarrollo y progresión de la fibrosis hepática (Hong-na Pan y col., 2006, Melhem A y col., 2006; Won-IL Jeong y col., 2008, Gao B y col., 2007, Byun JS y col., 2010, Miller AM y col., 2011) a través de las células NK las cuales parecen estar implicadas en los procesos que modulan la inhibición y regeneración de la fibrosis hepática (Radaeva S y col., 2006, Jeong WI y col., 2006, Chen Y y col., 2007, Hines IN y col., 2007, Sun R y col., 2006), y Melhem A y col., 2006).

Cabe destacar la inexistencia de estudios previos que analicen los repertorios polimórficos de los genes KIR/HLA-C en pacientes con cirrosis alcohólica.

Nuestros resultados muestran diferencias en las frecuencias de genes KIR entre controles sanos y pacientes con cirrosis alcohólica viral y no viral mostraron en ciertos genes diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones analizadas.

Por una parte, se observó una disminución significativa de la frecuencia de KIR2DL2+/S2+ en pacientes con cirrosis alcohólica (53.0%) respecto a los controles sanos (63.3%). Esta disminución no era debida a la presencia o ausencia de infecciones virales asociadas al proceso cirrótico, aunque se observó significación estadística de esta disminución en la población sin infección viral asociada ($P = 0,015$; OR = 1,557; IC del 95%: 1,095-2,215).

Esto parece indicar que la presencia de la pareja génica KIR2DL2+/S2+ está en individuos sanos en mayor proporción que en individuos enfermos por cirrosis alcohólica. Esta presunta protección observada en nuestro estudio es imposible de adjudicar a cualquiera de los dos genes analizados (KIR2DL2+/S2+) ya que en nuestra

población muestran un fuerte desequilibrio de unión entre ambos genes, a pesar de codificar receptores con funciones opuestas en la célula NK (función inhibidora y activadora, respectivamente). Por lo tanto, es imposible por lo tanto asignar adecuadamente el efecto beneficioso de un gen particular sobre el desarrollo de esta hepatopatía.

Diversos estudios indican que las señales de inhibición producidas por los genes iKIR son más fuertes que las producidas por los genes aKIR (Parham P. y col., 2004) y que las células NK regulan su función citotóxica mediante el equilibrio entre los receptores inhibidores y activadores de su superficie celular (Moretta A y col., 2001).

Quizás, el efecto global que observamos en los pacientes sanos de nuestro estudio sea debido a la acción de KIR2DL2+ y no de KIR2DS2+. El posible mecanismo que podría estar funcionando en estos pacientes sanos que no tienen ningún tipo de daño hepático y que no consumen alcohol, podría ser debido a que la acción citotóxica natural de las células NK está inhibida por la interacción de KIR2DL2 y su ligando MHC-I presente en CHE normal (no activada y no productora de colágeno) lo cual impide la muerte de CHE por la célula NK (Melhem A y col., 2006) teniendo el individuo un hígado sano sin ningún daño.

Posteriormente se profundizó en el estudio de dosis alélica del gen KIR2DL2+ en población sana y enferma. Se analizó el estado de homocigosis o heterocigosis de KIR2DL2+ y se observó que el efecto previamente observado en la población sana solamente se corroboraba cuando KIR2DL2+ se encontraba en heterocigosis con KIR2DL3+ (KIR2DL2+/L3+) ($P=0.022$), es decir la presencia en el individuo sano de una sola dosis alélica de KIR2DL2+ o bien la presencia conjunta de dos iKIR inhibidores.

Cabe destacar que la ausencia del gen KIR2DL2+ (KIR2DL2-; que equivalente en nuestra población a los individuos KIR2DL3+ en homocigosis), muestra una distribución de frecuencias contraria, observándose un aumento de KIR2DL3+ en los pacientes enfermos y con infección viral y disminuida en los individuos sanos. Sin embargo el análisis de frecuencias en ambas poblaciones para KIR2DL3+ no mostró *per se* ninguna distribución estadísticamente significativa.

Otros resultados significativos fueron obtenidos respecto al gen activador KIR2DS5, donde se observó un aumento de la presencia de este gen en pacientes con cirrosis alcohólica sin infección viral asociada respecto a individuos sanos ($P = 0,002$, $OR = 0,556$, IC del 95%: 0,384-0,080), no observándose este hecho en aquellos pacientes con infección viral asociada. Sugiere que KIR2DS5 puede actuar como un factor de susceptibilidad para el desarrollo de la cirrosis alcohólica en ausencia de infección viral. Parece que este aumento de aKIR en las células NK del paciente con cirrosis alcohólica está protegiendo al paciente por una parte de una infección viral asociada a la hepatopatía alcohólica pero contribuyendo al desarrollo de la cirrosis alcohólica.

Observaciones similares fueron obtenidas por Legaz y col., 2013 cuando se analizaron la frecuencia de genes KIR en una extensa cohorte de pacientes sometidos a trasplante hepático por distintas indicaciones ($n=402$) y se comparó con un grupo extenso controles sanos. Observaron un aumento significativo en la frecuencia del gen KIR2DS5 en la población de trasplante de hígado en comparación con el control sano ($P = 0,016$). Este aumento se debió probablemente al alto número de pacientes con cirrosis alcohólica incluidos en el estudio, como se muestran los datos demográficos publicados por Legaz y col., 2013.

Cabe destacar que también se ha observado un aumento en la frecuencia de los restantes genes KIR activadores teloméricos analizados (KIR2DS1, KIR2DS5 y KIR2D3DS1) en la población de pacientes con cirrosis alcohólica sin infección viral asociada, pero sólo KIR2DS5+ tiene un aumento estadísticamente significativo en comparación con el grupo sano control y la población con cirrosis alcohólica infectada por virus. En ningún caso se observó una potenciación debida a aKIR de los efectos observados en los individuos portadores del gen KIR2DS5+.

Por lo tanto los datos parecen indicar que la presencia de KIR2DS5+ en el individuo alcohólico tiene un efecto pro-fibrótico, quizás este efecto sea debido a la interacción con ligandos desconocidos presentes en linajes celulares involucrados en la producción de proteínas de la matriz extracelular y colágenos (miofibroblastos, células progenitoras derivadas de médula ósea), así como en células Kupffer cuyo efecto pro-fibrótico está mediado a través de la producción de diferentes interferones y citoquinas necesarias para activar a las células hepáticas estrelladas (Pinzani M y col., 1999a, b, Friedman SL., Y col., 2000a, b).

Quizás otro mecanismo de acción del receptor KIR2DS5 sería tener un posible ligando en los hepatocitos dañados por el alcohol promocionando la apoptosis y la muerte celular. Sugiriendo que en las etapas avanzadas de la enfermedad, la célula NK con este tipo de receptores en su superficie podría promover procesos profibróticos en el hígado en vez de los procesos antifibróticos previamente establecidos en etapas iniciales de esta enfermedad hepática (Muhanna N y col., 2011; Notas G y col., 2009; Jeong WI y col., 2008).

Sorprendentemente, como en el caso de la pareja genética KIR2DL2+/S2+, estos efectos se observan en pacientes con cirrosis alcohólica no viral de más de 54 años pero no menores de 54 años.

A día de hoy, KIR2DS5+ no tiene asociado ningún ligando conocido (Parham y col., 2012) específico, y aún no se ha demostrado ninguna interacción entre KIR2DS5 y cualquier molécula HLA clase I, aunque recientemente se ha sugerido una asociación con HLA-C1 en la protección contra la espondilitis anquilosante (o proteger del rechazo agudo de injerto renal (Nowak I y col., 2010) y estudios que lo relacionan con HLA-C (C2) en enfermedades como la endometriosis (Nowak I y col., 2015; Nakimuli y col. 2015), y en el caso de trasplante de células madre hematopoyéticas, parece que la supervivencia libre de leucemia y la tasa de recaída dependían de la presencia o ausencia del gen donante KIR2DS5 así como del C1/C2 frente a C1/C1 o C2/C2 del receptor (van der Meer y col., 2008). Además, numerosas publicaciones que implican la presencia del gen KIR2DS5 en diversas patologías (Ashouri E y col., 2012; Lu L y col., 2011) y otras como protección contra algunas condiciones clínicas (Díaz-Peña R y col., 2008, Ploski R y col., 2006).

Posteriormente, se reanalizaron los genes KIR en una cohorte de individuos con una edad superior a 54 años y se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en la población general, tanto para el gen inhibidor KIR2DL2+ como para el gen activador KIR2DS5+, mejorándose incluso las diferencias observadas mejorándose incluso las significaciones estadísticas obtenidas previamente, siendo más notable la diferencia en las frecuencias para el gen activador KIR2DS5+.

Sin embargo, cuando se realizó el mismo estudio en individuos sanos y enfermos con edades inferiores a los 54 años, no se observó ninguna diferencia en las frecuencias que mostrase significación estadística.

Quizás este hecho pueda ser explicado por la expresión diferencial del receptor KIR2DS5+ a lo largo de la edad de los individuos analizados y que este hecho pueda influir en el desencadenamiento de la enfermedad en aquellos individuos susceptibles y

con consumo crónico de alcohol asociado, ya que diversos estudios ponen en evidencia que cambios en los subconjuntos de células NK y expresión de receptores de células NK parecen ser importantes en la patogénesis de diferentes enfermedades, como la infección viral (Mavilio D y col., 2003; Guma M y col., 2004; Ballan WM y col., 2007) y el cáncer (Verheyden S y col., 2004; Kiladjian JJ y col., 2006; Epling-Burnette PK y col., 2007; Garcia-Iglesias T y col., 2009).

En este sentido parece que en nuestra cohorte de pacientes mayores de 54 años la inmunosenescencia del sistema inmune innato es crucial para comprender los mecanismos subyacentes al desarrollo de esta enfermedad relacionada por una parte con la edad del paciente y por otra parte al efecto citotóxico del alcohol en el hígado a lo largo de la vida del individuo.

Por lo tanto, todos estos estudios parecen indicar que la preservación de la citotoxicidad celular NK puede ser crítica para la resistencia a enfermedades relacionadas con la edad y para el envejecimiento saludable (Mocchegiani E y col., 2004; Bruunsgaard H y col., 2001).

La mayoría de los estudios sobre las células NK y el envejecimiento se han centrado en analizar el número de células NK y su actividad citotóxica global NK, pero poco se sabe sobre los cambios en los receptores NK durante el envejecimiento. Abedin S. y col. 2005, también observaron una disminución relacionada con la edad en la expresión de NKG2D en células T convencionales. Sin embargo, diferentes estudios demuestran aumentos en la expresión de receptores relacionados con NK, tales como CD16, CD56, CD57 y CD94, y en las células T de personas mayores (Tarazona R y col., 2000; Borrego F y col., 1999; Lemster BH y col., 2008).

Con respecto a estudios de inmunosenescencia en humanos, hay tres importantes investigaciones han sido publicados en esta área, por una parte Lutz y col. 2005

compararon ancianos (de 65 años) y los adultos 21-30 años) y observaron una disminución relacionada con la edad en la expresión de CD94 y NKG2A y de manera recíproca un aumento en la expresión KIR relacionada con el aumento de la edad. Sin embargo estos autores no estudiaron, la expresión de otros receptores, tales como NKG2D.

Sundstrom Y y col.2007 examinaron la expresión de los receptores NK en la fase temprana de la infancia (niños 2 y 5 años de edad). Ellos encontraron que la proporción de CD94 NKG2C- (NKG2A) y los niveles de expresión de NKG2D, NKp30 y NKp46 se incrementaron.

Garff-Tavernier y col.2010, analizaron y compararon la expresión de receptores de células NK derivados de la sangre del cordón umbilical, en individuos de mediana edad (18-60 años), de edad (60-80 años), y sujetos añosos (80-100 años), y observaron que las células NK mostraban características específicas asociadas con la inmadurez, como una mala expresión de KIR y alta expresión de NKG2A en individuos jóvenes. Por el contrario, las células NK de sujetos mayores, preservaron sus principales características fenotípicas y funcionales en este estudio.

Almeida-Oliveira A. y col. 2011, analizaron la expresión en 3 de las principales familias de receptores presentes en las células NK (KIRs, NCRs y lectinas tipo C) en 3 grupos de edad, por un lado niños (edad ≤ 18 años), adultos (edad 19–59 años), y adultos con edad avanzada (edad ≥ 60 años). Almeida-Oliveira A. y col. 2011 analizaron la expresión de receptores no solamente en la población total de células NK, sino también en subpoblaciones NK (CD56 dim y CD56 bright) y linfocitos T.

El porcentaje de población de células T clásica ($P=0.035$) se redujo en el grupo de ancianos, pero el porcentaje de las subpoblaciones CD4 y CD8 no fueron afectados por

la edad. Tampoco se observaron diferencias en el porcentaje de población de células NKT entre los diferentes grupos de edad (figura 88).

	Median of cell population				p Value (Mann-Whitney test)	
	All subjects	Children	Adult	Elderly	Children vs adults	Adults vs elderly
Percentage (%)						
T cells	66.79	70.75	66.81	64.54	0.100	0.035
CD4 T cells	43.33	41.80	44.71	45.80	0.262	0.865
CD8 T cells	31.05	31.94	31.05	29.45	0.592	0.815
NKT cells	5.88	5.93	5.90	5.67	0.425	0.533
NK cells	9.58	7.52	8.93	14.85	0.294	<0.001
CD56 ^{dim} NK subset	95.34	94.36	94.52	97.45	0.579	0.001
CD56 ^{bright} NK subset	4.66	5.64	5.48	2.59	0.579	0.001
Absolute numbers (cells/mm³)						
WBC count	6400	7620	5500	7545	0.009	0.009
T cells	1152	1561	1048	1163	0.001	0.622
CD4 T cells	815	979	702	879	0.007	0.296
CD8 T cells	584	779	466	657	0.001	0.139
NKT cells	106	119	94	113	0.333	0.921
NK cells	192	218	141	293	0.028	<0.001
CD56 ^{dim} NK subset	184	209	136	279	0.049	<0.001
CD56 ^{bright} NK subset	8	9	7	9	0.579	0.375

Percentage values represent the frequency of T cells, CD4 T cells, CD8 T cells, NKT cells, and NK cells among all peripheral blood lymphocytes or the frequency of CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells among the NK-cell population. Significant *p* values are highlighted in boldface type.

Figura 88. Frecuencia de las células T, NKT, NK, CD56 bright en sangre de sujetos de diferentes edades (Figura extraída de Almeida-Oliveira A. y col. 2011)

El porcentaje de población de células NK aumentó significativamente en el grupo de edad de adultos en comparación con los ancianos ($P=0.001$), pero no hubo diferencias significativas en esta población entre niños y adultos (figura 88).

Cuando examinaron estas subpoblaciones de células NK durante la senescencia humana encontraron un ligero pero significativo ($p = 0.001$) aumento en el porcentaje de células NK CD56 dim en sujetos de edad avanzada en comparación con adultos jóvenes. Por el contrario, observaron una disminución significativa ($p = 0.001$) en la frecuencia de células NK CD56 bright en sujetos de edad avanzada respecto a la población adulta.

Este estudio también observó que la actividad NK estaba preservada desde la niñez hasta la edad adulta, no existiendo diferencias significativas en el porcentaje de lisis entre niños, adultos y ancianos.

Por otra parte, estos autores analizaron la expresión de los receptores de las células NK y observaron como la edad afecta a la expresión de receptores KIR en las células CD56 bright pero no en el resto de poblaciones analizadas. La expresión de receptores KIR no se alteró (independientemente de la edad o del sexo) en las células CD56 dim (Figura 89). En contraste, se observaron cambios relacionados con la edad en la expresión de casi todos los genes KIRs evaluados en el subconjunto de células NK CD56 bright tanto cuando se comparan los niños como los adultos como cuando se comparan los adultos con los ancianos (≥ 60 años) (Figura 89).

	Median percentage of cell population expressing each receptor				p Value (Mann-Whitney test)	
	All subjects	Children	Adults	Elderly	Children vs adults	Adults vs elderly
T cells						
NKG2D	35.65	37.58	36.18	28.77	0.108	0.034
NKT cells						
CD158a	3.41	5.10	2.73	3.69	0.473	0.528
CD158b	12.03	9.78	12.18	12.62	0.621	1.000
CD158e	3.12	3.54	3.44	2.37	0.592	0.304
KIRmix	18.67	18.35	16.08	22.38	0.633	0.386
CD158i	5.24	3.86	7.55	5.18	0.117	0.865
CD94	28.13	28.13	31.48	15.90	0.538	0.009
NKG2D	86.47	88.28	85.06	91.10	0.327	0.533
NK cells						
CD158a	19.63	19.76	19.63	17.48	0.694	0.929
CD158b	26.42	25.55	26.42	31.46	0.880	0.698
CD158e	11.86	14.18	11.37	6.78	0.193	0.901
KIRmix	50.35	48.77	46.62	53.96	0.588	0.119
CD158i	7.73	4.08	14.54	5.79	0.107	0.704
NKp46	77.34	78.79	82.37	67.57	0.499	0.003
NKp30	46.44	36.85	60.96	33.24	0.005	<0.001
CD94	56.47	49.30	61.09	49.08	0.028	0.014
NKG2D	96.56	94.11	96.74	97.01	0.271	0.961
CD56 ^{dim} subset						
CD158a	20.61	21.75	20.61	17.92	0.635	0.929
CD158b	28.30	25.74	28.30	32.64	0.912	0.777
CD158e	12.27	14.70	11.71	6.91	0.207	0.895
KIRmix	52.87	48.39	49.74	54.98	0.879	0.225
CD158i	7.27	3.60	14.56	4.88	0.106	0.633
NKp46	74.97	77.31	81.45	64.75	0.551	0.003
NKp30	44.47	33.70	59.24	31.67	0.006	<0.001
CD94	55.16	44.38	59.27	45.15	0.012	0.016
NKG2D	95.84	93.61	96.01	96.36	0.327	0.929
CD56 ^{bright} subset						
CD158a	4.00	7.20	2.70	6.67	0.007	0.011
CD158b	5.71	9.12	4.38	9.78	0.004	0.003
CD158e	2.81	3.64	1.79	3.73	0.474	0.042
KIRmix	10.76	14.29	7.49	14.39	0.018	0.001
CD158i	5.33	5.00	4.76	10.16	0.391	0.059
NKp46	98.09	98.85	98.80	96.15	0.943	0.034
NKp30	65.30	45.00	91.94	48.73	0.003	<0.001
CD94	95.67	94.42	98.13	93.75	0.126	0.009
NKG2D	98.82	96.62	99.10	98.51	0.092	0.583

Values shown represent the median percentage of cells within each population that expressed a given NK receptor. Significant p values are highlighted in bold.

Figura 89 Frecuencia de los diferentes grupos celulares y receptores en los diferentes grupos de edad (Figura extraída de Almeida-Oliveira A. y col. 2011)

Curiosamente los anticuerpos CD158a y CD158b que detectan a los receptores KIR2DL1/S1 y KIR2DL2/KIR2DL3 respectivamente, disminuyen significativamente de la niñez al estado adulto para posteriormente aumentar en la vejez en las células CD56 brigh. Quizás este singular hecho sea debido al amplio rango de edad que comprende en este estudio el grupo de individuos pertenecientes a los adultos.

En este estudio no se pudo determinar la presencia del receptor KIR2DS5 mediante citometría de flujo, ya que actualmente no existe ningún anticuerpo que lo detecte de manera específica. Por otro lado, si extrapolamos estas observaciones a nuestros datos, podemos decir que los pacientes varones con cirrosis alcohólica portadores de los genes KIR2DL2/S2+ probablemente tengan una disminución de la expresión de estos receptores en el subgrupo de células CD56 brigh y quizás sea por ello que observemos el efecto de protección global frente a la cirrosis alcohólica ya que además se suma el hecho de la baja frecuencia de ambos genes en la población enferma respecto a los controles sanos.

El análisis de la frecuencia de genes KIR analizados por Almeida-Oliveira A. y col. 2011 reveló que todas las frecuencias eran comparables entre los tres grupos de edad analizados, con la excepción de KIR2DL5 y KIR2DS3. La frecuencia de ambos genes KIR aumentaron significativamente en el grupo de edad (KIR2DL5 (48%) y KIR2DS3 (32%) en comparación con los adultos (KIR2DL5 (22%) y KIR2DS3 (12%), $p = 0.05$).

La frecuencia de ligandos KIR conocidos tanto del grupo HLA-C 1, grupo HLA-C 2 y BW4) también fueron analizados, pero no observaron ninguna diferencia entre grupos.

Todos los pacientes de nuestro estudio declararon consumo previo de consumo de alcohol por lo que la etiología de su hepatopatía fue relacionada con el alcohol en todos

los pacientes. En este estudio no ha podido extraer datos sobre el tipo de alcohol, la cantidad o la intensidad ni edad de inicio del consumo. A pesar de estas limitaciones, los resultados son consistentes con una población masculina española que desarrolló cirrosis alcohólica terminal y que es sometida a trasplante hepático.

El tamaño muestral utilizado para este estudio de asociación genética es adecuado tanto para el grupo control como para la cohorte de pacientes con cirrosis alcohólica permitiendo obtener resultados estadísticamente confiables, aunque habría sido deseable una cohorte mayor de pacientes con cirrosis alcohólica vírica. Sin embargo ha sido posible realizar todos los tratamientos estadísticos en este estudio, no existiendo ninguna limitación en los resultados como consecuencia del número de pacientes analizados.

No es posible extrapolar a otras poblaciones debido a las grandes diferencias en los repertorios de genes KIR existentes entre las diferentes poblaciones del mundo.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- 1- La cirrosis alcohólica es la principal indicación a trasplante hepático en la Región de Murcia (38.4%) junto con la cirrosis viral (24.1%), siendo el VHC el principal virus causal (76.9%), seguido del VHB (16.3%).
- 2- La cirrosis alcohólica es la indicación más frecuente en hombres (50.3%), mientras que las infecciones virales son la principal indicación a trasplante hepático en mujeres (32.9%).
- 3- La edad media del total de pacientes trasplantados es de 51.10 ± 0.38 (años $\pm$ DE), independientemente del sexo del paciente. Esta edad media es similar al resto de indicaciones a trasplante analizadas, excepto en los pacientes con indicación a trasplante por hepatitis fulminante donde la edad media es significativamente menor 36.77 ± 2.72 (años $\pm$ DE) y en carcinoma hepatocelular donde la edad media es ligeramente mayor que la del resto de los grupos analizados 54.61 ± 1.22 (años $\pm$ DE).
- 4- El número de trasplante hepáticos por cirrosis alcohólica ha sido elevada a lo largo de los años, alcanzando su máximo en el años 2010, a partir de esta fecha se observa un descenso igualándose a los pacientes trasplantados por cirrosis viral.
- 5- La supervivencia de la cirrosis alcohólica es significativamente mayor que el resto de indicaciones analizadas, observándose una supervivencia menor en los pacientes con cirrosis alcohólica e infección viral asociada.
- 6- La edad media de los pacientes trasplantados por cirrosis alcohólica es 53.63 ± 0.495 (años $\pm$ DE), similar entre ambos sexos e independiente de la comorbilidad viral. La infección viral más frecuente en nuestra población de varones con cirrosis alcohólica es de VHC (61.8%).
- 7- La mayoría de los pacientes varones tienen ascitis grado II (43.2%), siendo significativo cuando el paciente cirrótico presentaba comorbilidad viral (59.0%; $P=0.026$). La

encefalopatía se presenta en el 43.5% de los pacientes varones, independientemente de la infección por virus. El nivel de encefalopatía que presentan los pacientes es de grado I (41.9%) y de grado II (46.5%).

- 8- En el paciente varón con cirrosis alcohólica todos los parámetros bioquímicos se encuentran elevados, excepto la creatinina que se encuentra dentro de la normalidad (1.08 ± 0.05 mg/dl), y la actividad de protrombina que se encuentra disminuida (58.93 ± 0.94).
- 9- El 52.1% de los pacientes varones con cirrosis alcohólica tienen un índice pronóstico Child-Pugh de clase B, y un 71.2% de los pacientes presentan un valor de MELD comprendido entre 10-19.
- 10- El gen KIR2LD2/S2+ se encuentra aumentado significativamente ($P=0.013$) en la población de varones sanos (63.3%) respecto al total de pacientes varones con cirrosis alcohólica (53.0%), especialmente cuando los últimos no presentan virus asociados (52.6%) ($P=0.015$), lo que podría indicar que KIR2LD2/S2+ actúa como factor protector al desarrollo de la cirrosis alcohólica.
- 11- El gen KIR2DS5+ se encuentra aumentado de manera significativa ($P=0.033$) en la población total de pacientes con cirrosis alcohólica (35.2%) respecto a la población sana total (27%), siendo más acusada esta diferencia estadísticamente significativa en la cohorte de pacientes con cirrosis alcohólica con infección viral asociada (39.9%, $P=0.002$) lo que parece indicar que KIR2DS5+ pueda actuar como factor de susceptibilidad a desarrollar cirrosis alcohólica.
- 12- Los pacientes con infección viral presentan solamente el 20.6% del gen KIR2DS5+ respecto al 39.9% de los pacientes sin infección viral ($P=0.004$), lo que podría indicar que actúa como factor protector en la infección viral en este grupo de pacientes.
- 13- La frecuencia de individuos heterocigotos KIR2DL2/L3+ está aumentada en pacientes sanos (51.3%), respecto al total de pacientes con cirrosis alcohólica (41.6%) ($P=0.022$),

mientras que los individuos homocigotos para el gen KIR2DL3 están aumentados en el total de pacientes con cirrosis alcohólica ($P=0.010$).

- 14- En la población enferma (56%) hay un aumento significativo de la relación KIR2DS5+/KIR2DL2+ respecto a los controles sanos (42%; $P=0.001$), y una disminución de la frecuencia conjunta de KIR2DL2+/S2+ y el resto de genes KIR de los pacientes con cirrosis alcohólica.
- 15- Los genes KIR2DL2+/KIR3DL3+, KIR2DL2+/KIR2DL3+ y KIR3DL1+/2DS2+, están disminuidos de manera significativa en pacientes con cirrosis alcohólica respecto al grupo control ($P=0.016$, $P=0.027$, $P=0.017$, respectivamente).
- 16- En la población de pacientes hay un aumento de la ausencia del epítipo C1 respecto a los controles sanos (23.5% vs 15.3%, $P=0.007$), dato que también se observa en el grupo de pacientes sin infección viral asociada ($P=0.006$). Por el contrario, la presencia o ausencia del epítipo C2 no muestra diferencias entre la cohorte de individuos sanos y enfermos.
- 17- El genotipo C2C2 se encuentra significativamente aumentado en pacientes con cirrosis alcohólica respecto a controles sanos (23.5% vs 15.3%; $P=0.015$), observándose resultados similares al comparar la población de individuos sanos con la población de enfermos sin infección viral asociada (23.5% vs 15.3%; $P=0.021$).
- 18- Los genes KIR2DL2 y KIR2DL3 asociados al ligando C1+ están disminuidos en el grupo de pacientes respecto a los controles (83.4% vs 76.2% y 85% vs 75.9%, respectivamente), aunque esta disminución sólo es significativa para la combinación de KIR2DL3 con C1+ ($P=0.010$).
- 19- El gen KIR2DS4 asociado al ligando C1+ se encuentra disminuido en los pacientes respecto al grupo control (84.7% vs 76.3, $P=0.013$), así como KIR2DS5 con el ligando C1+ que también es menos frecuente en los pacientes, aunque en este caso sin alcanzar significación estadística (84.3% vs 72.9%, $P=0.072$).

- 20- La combinación de KIR2DL2 con el genotipo C1C1 está aumentada en el grupo de pacientes con cirrosis alcohólica viral respecto a la no viral (45.9% vs 24.5%, $P=0.021$). También se encuentra aumentada la combinación de KIR2DL3/C2C2 respecto a los controles (15% vs 24.1%, $P=0.010$), con resultados similares en pacientes con cirrosis sin virus respecto al grupo control (15% vs 23.6%, $P=0.026$).
- 21- El gen KIR1DS4 asociado al genotipo C2C2 se encuentra aumentado en los pacientes (15.3% vs 23.7%, $P=0.013$), así como la frecuencia de KIR2DS5+ asociado al genotipo C2C2, aunque la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa (15.7% vs 27.1%, $P=0.072$).

ANEXOS

Anexo-I**Consentimiento Informado****AUTORIZACIÓN DE INCLUSIÓN EN ESTUDIO**

(Indicar grupo de estudio y procedencia)

Grupo estudio	Hospital	Servicio
Control ☐	H. Clínico U. Virgen de la Arrixaca	☐ Dermatología ☐
Paciente ☐	H. U. Reina Sofía	☐ Urología ☐
	H. U. Morales Meseguer	☐ Oncología ☐
	H. U. Santa Lucía	☐

Paciente, D./Dña. _____ con DNI _____
 _____, o en su defecto el representante legal o familiar,
 _____ con DNI _____,

Manifiesto que he sido informado/informada por el equipo facultativo que me atiende sobre las implicaciones de mi participación en el proyecto “**Estudio de genes KIR en pacientes con hábito etanólico que desarrollan cirrosis hepática alcohólica**” y que:

1. He leído o me ha sido leída esta hoja de consentimiento informado.
2. La información se me ha facilitado de forma comprensible
3. He recibido suficiente información del estudio.
4. He podido hacer preguntas sobre el estudio.
5. He hablado con (Nombre del investigador):
Dr.

En consecuencia comprendo que:

1. Mi participación es voluntaria.
2. Puedo retirarme del estudio:
 - Cuando quiera
 - Sin tener que dar explicaciones
 - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Que mi participación en este estudio consistirá en:

1. Donar una muestra de unos **20ml de sangre** periférica.
2. Autorizar su utilización para realizar **estudios celulares y moleculares** relacionados con mi patología.
3. Autorizar la **conservación de material genético (DNA) y suero**.
3. Si soy seleccionado, me será solicitada una segunda donación de **20ml de sangre** para completar los estudios celulares.

Beneficios: se nos ofrecerá un pronóstico más preciso y en caso de necesitar quimioterapia, una monitorización más cercana, y que potencialmente podría ayudar a mejorar la eficacia del tratamiento. Además, contribuirá a un mejor conocimiento de la enfermedad y de los mecanismos inmunológicos que regulan la aparición y formación de metástasis de mi enfermedad.

Igualmente he sido informado de los/las:

- **Consecuencias del procedimiento:** sin consecuencias.
- **Riesgos probables:** Hematoma en la zona de extracción, poco frecuente.
- **Riesgos personalizados:** no aplicable.
- **Contraindicaciones:** no se conocen.
- **Alternativas al procedimiento:** no hay.

Por su parte, **los investigadores se comprometen a:**

- 1- Asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos incluidos en el estudio, de conformidad a la **Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica** y documentos contenidos en el archivo.
- 2.- Que la participación en este estudio sea estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Sus respuestas al cuestionario y a la entrevista serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto, serán anónimas.
- 3- Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas a cualquiera de los investigadores responsables y en cualquier momento durante su participación en él.
- 4- Puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma. Si alguna de las preguntas durante la entrevista le parecen incómodas, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador o de no responderlas.

Por la presente el paciente o el representante legal o familiar **CONSIENTE** voluntariamente y firma.

En _____ a, _____ de _____ de 201__

Firma del médico informante Nombre del Médico: _____ Número _____ de _____ colegiado: _____	Firma del paciente, representante legal o familiar
---	--

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Paciente, D./Dña. _____ con DNI _____
_____, o en su defecto el representante legal o familiar,
_____ con DNI _____,

Por la presente el paciente o el representante legal o familiar decide REVOCAR el consentimiento informado para participar en el proyecto **“Estudio de genes KIR en pacientes con hábito etanólico que desarrollan cirrosis hepática alcohólica”**.

En _____ a, ____ de _____ de 201__

Firma del paciente, representante legal o familiar

Anexo-II

Documento informativo para el paciente

Se solicita su participación para un proyecto que consiste en un análisis genético de genes KIR, los cuales están implicados en la respuesta inmunitaria. Este estudio está dirigido a pacientes de la Región de Murcia que van a ser sometidos a un trasplante hepático, y a los pacientes donantes de órganos a los que se les va a realizar una extracción de hígado como parte de su proceso de donación de órganos (en cuyo caso da el consentimiento el representante legal o familiar), con la intención de analizar la influencia de estos genes en el desarrollo de cirrosis hepática.

Como parte de este proyecto, apoyado por el Comité Ético de Investigación Clínica, se le realizará una extracción de sangre, y los resultados genéticos obtenidos serán utilizados con fines de investigación, con objeto de aumentar los conocimientos sobre la cirrosis hepática, lo cual permitirá desarrollar nuevas estrategias y terapias preventivas.

Las muestras que usted dona al firmar el consentimiento informado que se le entrega junto con este documento informativo, serán congeladas y conservadas para su uso.

Su decisión acerca de participar o no en el proyecto no afectará en absoluto a la atención médica que le proporcionan sus médicos.

Antes de tomar su decisión haga tantas preguntas como desee hasta asegurarse de que lo ha entendido y desea participar.

Procedimientos del proyecto

El procedimiento para la obtención de las muestras no implica ninguna otra intervención además de su extracción de sangre u orina para controlar como evoluciona su enfermedad.

Una vez otorgado su consentimiento y obtenida la muestra y respondido a las preguntas de los diferentes cuestionarios, habrá concluido su participación en el proyecto, y no se le exigirá que dedique ningún tiempo extra al mismo.

Riesgos y beneficios

La participación en el proyecto no le supone ningún riesgo, únicamente las molestias físicas de un simple pinchazo de una vena del brazo. A veces, muy raramente, le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve inflamación que remitirá en pocos días.

Como beneficios, contribuirá a ampliar conocimientos acerca de los genes KIR y como puede influir en el desarrollo de determinadas enfermedades hepáticas. Si lo desea, podrá solicitar información acerca de los resultados genéticos individuales y/o generales confirmados que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.

Compensación

Usted no recibirá ninguna compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación. Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Si usted decide no participar, se le garantiza que en ningún caso cambiarán los cuidados médicos que pudiera necesitar ni su relación con el equipo médico que le atiende.

Confidencialidad

Toda la información que se obtenga al analizar las muestras que nos cede, será considerada confidencial y tratada en consecuencia. Para garantizar el anonimato de su identidad, las muestras irán identificadas desde el momento mismo de la extracción con un código, no con su nombre.

En cualquier caso, todo el proceso de confidencialidad se basará en la LEY ORGÁNICA 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (BOE núm. 298 de 14 de Diciembre de 1999).

Participación voluntaria

Su participación en el proyecto de investigación mencionado es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar.

Tiene Derecho a la revocación del consentimiento y sus efectos, incluida la posibilidad de la destrucción de la muestra y de que tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo, sin tener que explicar los motivos de su revocación. Su no participación o retirada posterior del consentimiento no tendrá perjuicio de su tratamiento médico. Además tiene derecho a decidir el destino de sus muestras y datos personales en caso de decidir retirarse del estudio.

Anexo-III**Modelo de análisis por Luminex**HOSPITAL VIRGEN DE LA ARRIZACA. SERVICIO DE INMUNOLOGIA

Results for: KIR-008

Report Date: 11/12/12
 Session ID: 271112 kir bea-1
 Lot Number: 05132X-KIR
 Specimen ID: T960
 Set Name: KIR 05132X
 QT Version: 2.6.1

Patient Name: _____
 Assay Date: 28/11/12
 Expire Date: 30/06/14
 Sample Location: O1
 Reviewed by: _____

Patient DOB: _____
 Accession #: _____
 Donor Center #: _____
 Donor #: _____
 Reported by: _____

Comments: No Comments for this specimen.

List of Loci/Alleles

AG1 Loci/Alleles: 2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS4*all full length, 2DS4*deletion Ex.5, 2DS4*full length Ex.5, 2DP1, 3DP1

AG2 Loci/Alleles: None

Reaction Pattern for: KIR-008

Reaction Pattern for: KR-006																	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
1	1	1	1	2	2	3	4	4	5	7	9	2	3	3	3	4	7
1	2	4	5	6	8	1	3	5	1	5	0	4	3	4	5	9	1
-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-

Sample Probe Hits:

Probe	Logic	MFI	Value	Low +	High -	Result	Override
100	KIR-008	1554	1	0	0	Pos	No
111	KIR-008	44.5	0.0185	0.11	0.09	Neg	No
112	KIR-008	283	0.1718	0.315	0.26	Neg	No
114	KIR-008	70	0.0371	0.22	0.18	Neg	No
115	KIR-008	868.5	0.5527	0.127	0.104	Pos	No
126	KIR-008	39.5	0.0159	0.12	0.1	Neg	No
128	KIR-008	768	0.4795	0.11	0.09	Pos	No
131	KIR-008	384	0.2375	0.349	0.286	Neg	No
143	KIR-008	1504	0.9668	0.344	0.281	Pos	No
145	KIR-008	1321.5	0.8487	0.22	0.18	Pos	No
151	KIR-008	202	0.121	0.333	0.273	Neg	No
175	KIR-008	2815.5	1.824	0.33	0.27	Pos	No
190	KIR-008	0	-0.013	0.11	0.09	Neg	No
200	KIR-008	1407.5	1	0	0	Pos	No
224	KIR-008	938	0.6602	0.228	0.187	Pos	No
233	KIR-008	1206	0.8568	0.398	0.326	Pos	No
234	KIR-008	982	0.6961	0.22	0.18	Pos	No
235	KIR-008	460.5	0.319	0.1	0.08	Pos	No
249	KIR-008	62.5	0.0312	0.33	0.27	Neg	No
271	KIR-008	86	0.0215	0.165	0.135	Neg	No

Technologist Review

Director Review

Supervisor Review

BIBLIOGRAFÍA

- Aberg F, Gissler M, Karlsten TH, Ericsson BG, Foss A, Rasmussen A, Bennet W, Olausson M, Line PD, Nordin A, Bergquist A, Boberg KM, Castedal M, Pedersen CR, Isoniemi H. Differences in long-term mortality among liver transplant recipients and the general population: A population-based Nordic study. *Hepatology*. 2014 Sep 29
- Abedin S, Michel JJ, Lemster B, Vallejo AN. Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: the new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. *Exp Gerontol* 2005;40:537–48
- Abedin S, Michel JJ, Lemster B, Vallejo AN. Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: the new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. *Exp Gerontol*. 2005;40(7):537-48
- Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2004;40(2):475-83
- Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology*. 1995;108(1):218-24
- Adam R, Karam V, Delvart V, O'Grady J, Mirza D, Klempnauer J, Castaing D, Neuhaus P, Jamieson N, Salizzoni M, Pollard S, Lerut J, Paul A, Garcia-Valdecasas JC, Rodríguez FS, Burroughs A; All contributing centers (www.eltr.org); European Liver and Intestine Transplant Association (ELITA). Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol*. 2012;57(3):675-88
- Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, Neuhaus P, Lerut J, Salizzoni M, Pollard S, Muhlbacher F, Rogiers X, Garcia Valdecasas JC, Berenguer J, Jaeck D, Moreno Gonzalez E; European Liver Transplant Association. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. 2003;9(12):1231-43
- Adams HG, Jordan C. Infections in the alcoholic. *Med Clin North Am*. 1984;68(1):179-200
- Adams WL, Magruder-Habib K, Trued S, Broome HL. Alcohol abuse in elderly emergency department patients. *J Am Geriatr Soc*. 1992;40(12):1236-40
- Adams WL, Yuan Z, Barboriak JJ, Rimm AA. Alcohol-related hospitalizations of elderly

- people. Prevalence and geographic variation in the United States. *JAMA*. 1993; 8;270(10):1222-5.
- Agarwal DP. Cardioprotective effects of light-moderate consumption of alcohol: a review of putative mechanisms. *Alcohol & Alcoholism*. 2002; 37(5):409–15
- Aguilera V, Berenguer M, Rubín A, San-Juan F, Rayón JM, Prieto M, Mir J. Cirrhosis of mixed etiology (hepatitis C virus and alcohol): Posttransplantation outcome-Comparison with hepatitis C virus-related cirrhosis and alcoholic-related cirrhosis. *Liver Transpl*. 2009 Jan;15(1):79-87
- Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation*. 2003; 28;107(3):443-7
- Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcão RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LC, Ornellas MH, Diamond HR. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol*. 2011 Apr;72(4):319-29
- Aloman C, Gehring S, Wintermeyer P, Kuzushita N, Wands JR. Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction. *Gastroenterology*. 2007;132(2):698-708
- Altamirano J, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. 2011 9;8(9):491-501
- Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A, Streeck H, Waring M, Meier A, Brander C, Lifson JD, Allen TM, Carrington M, Altfeld M. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med*. 2007 Nov 26;204(12):3027-36
- Amarapurkar DN, Amarapurkar AD. Spectrum of Alcoholic liver diseases. *Gastroenterology Today*. 1988;2:102–04
- Ammon E, Schäfer C, Hofmann U, Klotz U. Disposition and first-pass metabolism of ethanol in humans: is it gastric or hepatic and does it depend on gender? *Clin Pharmacol Ther*. 1996;59(5):503-13
- Ampurdanés S, Bruguera M. Cirrosis hepática compensada. En: Berenguer J editor. *Gastroenterología y Hepatología*. Tercera Edición, editora Elsevier Science. Barcelona;

2002. p. 643-645

Anand A, Ferraz-Neto B, Nightingale P, et al. J. Liver transplantation for alcoholic liver disease. Evaluation of a selection protocol. *Hepatology* 1997; 25:1478-1484

Anderson P. Alcohol and primary health care. *WHO Reg Publ Eur Ser.* 1996;64:1-90

Arroyo V, Colmenero J. Ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis: pathophysiological basis of therapy and current management. *J Hepatol.* 2003; 38 Suppl 1:S69-89

Arroyo V, Fernandez J, Ginès P. Pathogenesis and treatment of hepatorenal syndrome. *Semin Liver Dis.* 2008;28(1):81-95

Arroyo V, Ginès P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, Reynolds TB, Ring-Larsen H, Schölmerich J. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *International Ascites Club. Hepatology.* 1996 Jan;23(1):164-76

Arroyo V, Ginès P. Mechanism of sodium retention and ascites formation in cirrhosis. *J Hepatol.* 1993;17 Suppl 2:S24-8

Arroyo V. Pathophysiology, diagnosis and treatment of ascites in cirrhosis. *Ann Hepatol.* 2002;1(2):72-9

Babor TF, Higgins-Biddle JC, Saunders JB, Monteiro MG. AUDIT. Cuestionario de Identificación de los Trastornos debidos al Consumo de Alcohol: Pautas para su utilización en Atención Primaria. Organización Mundial de la Salud 2001. Traducción: José Martínez-Raga, Bartolomé Pérez Gálvez, Miguel Castellano Gómez, María Dolores Temprado Albalat.

Bachir NM, Larson AM. Adult liver transplantation in the United States. *Am J Med Sci.* 2012 Jun;343(6):462-9

Bailey SM, Cunningham CC. Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. *Hepatology.* 1998;28(5):1318-26

Ballan WM, Vu BA, Long BR, Loo CP, Michaelsson J, Barbour JD, y col. Natural killer cells in perinatally HIV-1-infected children exhibit less degranulation compared to HIV-1-exposed uninfected children and their expression of KIR2DL3, NKG2C, and NKp46 correlates with disease severity. *J Immunol* 2007;179:3362–70

- Banff Working Group, Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Charlotte F, Czaja A, Daskal I, El-Monayeri MS, Fontes P, Fung J, Gridelli B, Guido M, Haga H, Hart J, Honsova E, Hubscher S, Itoh T, Jhala N, Jungmann P, Khettry U, Lassman C, Ligato S, Lunz JG 3rd, Marcos A, Minervini MI, Mölne J, Nalesnik M, Nasser I, Neil D, Ochoa E, Pappo O, Randhawa P, Reinholt FP, Ruiz P, Sebach M, Spada M, Sonzogni A, Tsamandas AC, Wernerson A, Wu T, Yilmaz F. Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology*. 2006;44(2):489-501
- Baraona E, Lieber CS. Effects of ethanol on lipid metabolism. *J Lipid Res*. 1979;20(3):289-315
- Barouki R, Chobert MN, Finidori J, Aggerbeck M, Nalpas B, Hanoune J. Ethanol effects in a rat hepatoma cell line: induction of gamma-glutamyltransferase. *Hepatology*. 1983;3(3):323-9
- Bartlett AS, Ramadas R, Furness S, Gane E, McCall JL. The natural history of acute histologic rejection without biochemical graft dysfunction in orthotopic liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl*. 2002;8(12):1147-5
- Bartres C, Lens S. [Elastography of the liver (Fibroscan®) in hepatology]. *Rev Esp Enferm Dig*. 2013;105(4):235
- Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:277-300
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):209-18. Review. Erratum in: *J Clin Invest*. 2005;115(4):1100
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-18.
- Bataller R, Rombouts K, Altamirano J, Marra F. Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(2):231-44
- Batts KP. Acute and chronic hepatic allograft rejection: pathology and classification. *Liver Transpl Surg*. 1999;5(4 Suppl 1):S21-9
- Bautista AP. Chronic alcohol intoxication enhances the expression of CD18 adhesion molecules on rat neutrophils and release of a chemotactic factor by Kupffer cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995;19(2):285-90

- Becker U, Deis A, Sørensen TI, Grønbaek M, Borch-Johnsen K, Müller CF, Schnohr P, Jensen G. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. *Hepatology*. 1996;23(5):1025-9
- Beckett AG, Livingstone AV, Hill KR. Acute alcoholic hepatitis. *Br Med J*. 1961 Oct 28;2(5260):1113-9
- Beier JI, McClain CJ. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. *Biol Chem*. 2010;391(11):1249-64
- Bell H, Nordhagen R. HLA antigens in alcoholics, with special reference to alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*. 1980;15(4):453-6
- Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M, Saveria Crocè L, Sasso F, Pozzato G, Cristianini G, Brandi G. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. *Gut*. 1997 ;41(6):845-50
- Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, Cristianini G, Tiribelli C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*. 2000 18;132(2):112-7
- Beresford TP, Everson GT. Liver transplantation for alcoholic liver disease: bias, beliefs, 6-month rule, and relapse--but where are the data? *Liver Transpl*. 2000;6(6):777-8
- Berlakovich GA, Imhof M, Karner-Hanusch J, Gotzinger P, Gollackner B, Gnant M, Hanelt S, Laufer G, Muhlbacher F, Steininger R. The importance of the effect of underlying disease on rejection outcomes following orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 1996 27;61(4):554-60
- Bernal V, Bosch J. Gastroenterología y hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica. Cirrosis hepática. 2012
- Bhattacharya R, Shuhart MC. Hepatitis C and alcohol: interactions, outcomes, and implications. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36(3):242-52
- Biassoni R., Cantoni C., Marras D., Giron-Michel J., Falco M., Moretta L., Dimasi N. Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Mol Med* 2003; 7:376-387
- Biassoni R., Falco M., Cambiaggi A., Costa P., Verdiani S., Pende D., Conte R., Di Donato C.,

- Parham P., Moretta L. Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by “Group 2” or “Group 1” NK clones. *J Exp Med* 1995; 182:605-609
- Bishara A, Brautbar C, Zamir G, Eid A, Safadi R. Impact of HLA-C and Bw epitopes disparity on liver transplantation outcome. *Hum Immunol*. 2005;66(11):1099-105
- Biyik I, Ergene O. Acute myocardial infarction associated with heavy alcohol intake in an adolescent with normal coronary arteries. *Cardiol Young*. 2006;16(2):190-2
- Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J*. 1991; 1;5(3):271-7
- Bonacchi A, Petrai I, Defranco RM, Lazzeri E, Annunziato F, Efsen E, Cosmi L, Romagnani P, Milani S, Failli P, Batignani G, Liotta F, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1060-76
- Bonet Serra B, Barrio Merino A, Quintanar Rioja A, Alavés Buform M, Nevado Santos M. [Steatosis and cirrhosis secondary to insulin resistance in children. Possible physiopathological mechanisms]. *An Esp Pediatr*. 2002;56(4):353-6.
- Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, y col. NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol* 1999;34:253–65
- Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006; 1;841(1-2):96-109.
- Bosch J, D’Amico G, García-Pagán JC. Portal hypertension. En: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, eds. *Schiff’s Diseases of The Liver*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2002:429-86.
- Bosron WF, Li TK. Catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase isoenzymes. *Enzyme*. 1987;37(1-2):19-28
- Bosron WF, Li TK. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism.

Hepatology. 1986;6(3):502-10

Boyadjieva N, Dokur M, Advis JP, y col. Chronic ethanol inhibits NK cell cytolytic activity: role of opioid peptide beta-endorphin. *J Immunol*. 2001;167:5645–52

Boyadjieva NI, Chaturvedi K, Poplawski MM, y col. Opioid antagonist naltrexone disrupts feedback interaction between mu and delta opioid receptors in splenocytes to prevent alcohol inhibition of NK cell function. *J Immunol*. 2004;173:42–9

Boyington, J. C., Sun, P. D. A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 2001; 38:1007-1021

Boyton R. J., Altmann D. M. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 159:1-8

Boza C, Riquelme A, Ibañez L, Duarte I, Norero E, Viviani P, Soza A, Fernandez JI, Raddatz A, Guzman S, Arrese M. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. *Obes Surg*. 2005;15(8):1148-53

Bron B, Kubski D, Widmann JJ, von Flidner V, Jeannet M. Increased frequency of DR3 antigen in alcoholic hepatitis and cirrhosis. *Hepatogastroenterology*. 1982;29(5):183-6

Bruguera M, Rodés J. Cirrosis hepática compensada. Tratamiento de las enfermedades hepáticas y biliares. 2ª ed. En: Berenguer J, Bruguera M, García M, Rodrigo L (eds.) (Asociación Española para el Estudio del Hígado). ELBA, SA. Madrid 2001:99-104

Brunell JC, Li T-K, Bosron WF. Purification and steady-state kinetic characterization of human liver pip3 alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 1989. 28:6810-6815

Brunschwig H. Liber de arte distillandi, de simplicibus: Das Buch der rechten Kunst zu destillieren die einzige[n] Ding. Strassburg (Austria): Johan (Reinhard) Grüninger; 1500

Brunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhoj P, Pedersen BK. Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans. *Exp Gerontol* 2001;37:127–36

Buchsbaum DG, Buchanan RG, Welsh J, Centor RM, Schnoll SH. Screening for drinking disorders in the elderly using the CAGE questionnaire. *J Am Geriatr Soc*. 1992;40(7):662-5

Burnell JC, Li TK, Bosron WF. Purification and steady-state kinetic characterization of human

- liver beta 3 beta 3 alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*. 1989; 22;28(17):6810-5
- Burra P, Lucey MR. Liver transplantation in alcoholic patients. 2005;18(5):491-8
- Burra P, Mioni D, Cillo U et al. Long-term medical and psychosocial evaluation of patients undergoing orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease. *Transplant Int* 2000; 13: S174– S178
- Burra P, Senzolo M, Adam R, Delvart V, Karam V, Germani G, Neuberger J; ELITA; ELTR Liver Transplant Centers. Liver transplantation for alcoholic liver disease in Europe: a study from the ELTR (European Liver Transplant Registry). 2010 ;10(1):138-48
- Byun JS, Jeong WI. Involvement of hepatic innate immunity in alcoholic liver disease. *Immune Netw*. 2010;10(6):181-7
- Carr W H, Little A M, Mocarski E, Parham P. NK cell-mediated lysis of autologous HCMV-infected skin fibroblasts is highly variable among NK cell clones and polyclonal NK cell lines. *Clin Immunol*. 2002; 105:126
- Cella M, Longo A, Ferrara G B, Strominger J L, Colonna M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4- positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med*. 1994; 180:1235
- Center for Disease Control and Prevention. Alcohol and public health: alcohol-related disease impact (ARDI). Center for Disease Control and Prevention; 2012
- Chan H W, Kurago Z B, Stewart C A, Wilson M J, Martin M P, Mace B E, Carrington M, Trowsdale J, Lutz C T. DNA Methylation Maintains Allele-specific KIR Gene Expression in Human Natural Killer Cells. *J Exp Med*. 2003;197:245
- Chao YC, Liou SR, Chung YY, Tang HS, Hsu CT, Li TK, Yin SJ. Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase genes and alcoholic cirrhosis in Chinese patients. *Hepatology*. 1994 Feb;19(2):360-6
- Chawla RK, Eastin CE, Watson WH, Lee EY, Bagby GJ, McClain CJ. Sadenosylmethionine deficiency and tumor necrosis factor alpha in endotoxin-induced hepatic injury. En: Mato JM, Caballero A, editors. Methionine metabolism: molecular mechanism and clinical implication. Madrid: CSIC; 1996. p. 263-70

- Chedid A, Mendenhall CL, Gartside P, French SW, Chen T, Rabin L. Prognostic factors in alcoholic liver disease. VA Cooperative Study Group. *Am J Gastroenterol.* 1991 ;86(2):210-6
- Chedid A, Mendenhall CL, Moritz TE. The antigenic heterogeneity of the bile duct epithelium in alcoholic liver disease. VA Cooperative Study Group 275. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123(5):411-4
- Chen C, Busson M, Rocha V, Appert ML, Lepage V, Dulphy N, Haas P, Socié G, Toubert A, Charron D, Loiseau P. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38(6):437-44
- Chen GH, Yang Y, Lu MQ, Cai CJ, Zhang Q, Zhang YC, Xu C, Li H, Wang GS, Yi SH, Zhang J, Zhang JF, Yi HM. Liver transplantation for end-stage alcoholic liver disease: a single-center experience from mainland China. *Alcohol.* 2010 May;44(3):217-21
- Chiappelli F, Kung M, Lee P, Pham L, Manfrini E, Villanueva P. Alcohol modulation of human normal T-cell activation, maturation, and migration. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995;19(3):539-44
- Chiesa R, Donato F, Tagger A, Favret M, Ribero ML, Nardi G, Gelatti U, Bucella E, Tomasi E, Portolani N, Bonetti M, Bettini L, Pelizzari G, Salmi A, Savio A, Garatti M, Callea F. Etiology of hepatocellular carcinoma in Italian patients with and without cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 ;9(2):213-6
- Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg.* 1964;1:1-85
- Clouston AD, Jonsson JR, Powell EE. Steatosis as a cofactor in other liver diseases: hepatitis C virus, alcohol, hemochromatosis, and others. *Clin Liver Dis.* 2007 ;11(1):173-89
- Colonna M, Spies T, Strominger J L, Ciccone E, Moretta A, Moretta L, Pende D, Viale O. Alloantigen recognition by two human natural killer cell clones is associated with HLA-C or a closely linked gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:7983
- Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):413-25
- Comisión clínica de la delegación del gobierno para el plan nacional sobre drogas Ministerio

de Sanidad y Consumo, 2007

- Conjeevaram HS, Hart J, Lissos TW, Schiano TD, Dasgupta K, Befeler AS, Millis JM, Baker AL. Rapidly progressive liver injury and fatal alcoholic hepatitis occurring after liver transplantation in alcoholic patients. *Transplantation*. 1999 27;67(12):1562-8
- Cook RT, Li F, Vandersteen D, Ballas ZK, Cook BL, LaBrecque DR. Ethanol and natural killer cells. I. Activity and immunophenotype in alcoholic humans. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(6):974-80
- Cook RT. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system--a review. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(9):1927-42
- Cordoba J, Blei AT. Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis*. 1996;16(3):271-80
- Cordoba J. New assessment of hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 2011 May;54(5):1030-40
- Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, Arico S. Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis. 1999;94(10):1551-73
- Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, La Vecchia C. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. 2004;38(5):613-9
- Cortot A, Jobin G, Ducrot F, Aymes C, Giraudeau V, Modigliani R. Gastric emptying and gastrointestinal absorption of alcohol ingested with a meal. *Dig Dis Sci*. 1986;31(4):343-8
- Crabb DW, Bosron WF, Li T-K: Steady-state kinetic properties of purified rat liver alcohol dehydrogenase: Application to predicting alcohol elimination rates *in vivo*. *Arch Biochem Biophys* 224:299-309, 1983
- Crabb DW. Ethanol oxidizing enzymes: roles in alcohol metabolism and alcoholic liver disease. *Prog Liver Dis*. 1995;13:151-72
- Crabb DW. Pathogenesis of alcoholic liver disease: newer mechanisms of injury. *Keio J Med*. 1999 ;48(4):184-8
- Crum K A, Logue S E, Curran M D, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence

- repertoires. *Tissue Antigens*. 2000; 56:313
- Cuadrado A, Fabrega E, Casafont F, Pons-Romero F. Alcohol recidivism impairs long-term patient survival after orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease. *Liver Transplant* 2005;11: 420–426
- Cubero FJ, Urtasun R, Nieto N. Alcohol and liver fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2009;29(2):211-21
- Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem*. 1990 11;192(2):245-61
- Devière J, Denys C, Schandene L, Romasco F, Adler M, Wybran J, Dupont E. Decreased proliferative activity associated with activation markers in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. 1988;72(3):377-82
- Dew MA, Switzer GE, Goycoolea JM, Allen AS, DiMartini A, Kormos RL, Griffith BP. Does transplantation produce quality of life benefits? A quantitative analysis of the literature. *Transplantation*. 1997; 15;64(9):1261-73
- Di Lelio A, Cestari C, Lomazzi A, Beretta L. Cirrhosis: diagnosis with sonographic study of the liver surface. *Radiology*. 1989;172(2):389-92
- Diehl AM. Cytokines and the molecular mechanisms of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999;23:1419-24
- Dohmen K, Baraona E, Ishibashi H, Pozzato G, Moretti M, Matsunaga C, Fujimoto K, Lieber CS. Ethnic differences in gastric sigma-alcohol dehydrogenase activity and ethanol first-pass metabolism. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20(9):1569-76
- Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol*. 1996;156:3098
- Donohue TM Jr, Cederbaum AI, SW, Barve S, Gao B, Osna NA. Role of the proteasome in ethanol-induced liver pathology. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(9):1446-59
- Douds AC, Cox MA, Iqbal TH, Cooper BT. Ethnic differences in cirrhosis of the liver in a British city: alcoholic cirrhosis in South Asian men. *Alcohol Alcohol*. 2003 Mar-Apr;38(2):148-50
- Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of

hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. Clin Chem. 2000 ;46(12):2050-68

Dumortier J, Guillaud O, Adham M, Boucaud C, Delafosse B, Bouffard Y, Paliard P, Scoazec JY, Boillot O. Negative impact of de novo malignancies rather than alcohol relapse on survival after liver transplantation for alcoholic cirrhosis: a retrospective analysis of 305 patients in a single center. Am J Gastroenterol. 2007 May;102(5):1032-41

Dupont B, Selvakumar A, Steffens U. The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q13.4. Tissue Antigens. 1997;49(6):557-63

Eastman JT, DeVries AL. Hepatic ultrastructural specialization in Antarctic fishes. Cell Tissue Res. 1981;219(3):489-96

Edenberg HJ, Dick DM, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer LO, Crowe RR, Goate A, Hesselbrock V, Jones K, Kwon J, Li TK, Nurnberger JI Jr, O'Connor SJ, Reich T, Rice J, Schuckit MA, Porjesz B, Foroud T, Begleiter H. Variations in GABRA2, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. Am J Hum Genet. 2004;74(4):705-14

Edmondson HA, Peters RL, Frankel HH, Borowsky S. The early stage of liver injury in the alcoholic. Medicine (Baltimore). 1967;46(2):119-29

Ehlers CL, Gilder DA, Wall TL, Phillips E, Feiler H, Wilhelmsen KC. Genomic screen for loci associated with alcohol dependence in Mission Indians. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2004 15;129B(1):110-5

Ehlers CL, Liang T, Gizer IR. ADH and ALDH polymorphisms and alcohol dependence in Mexican and Native Americans. Am J Drug Alcohol Abuse. 2012

;38(5):389-94

Ellis G, Goldberg DM, Spooner RJ, Ward AM. Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. Am J Clin Pathol. 1978;70(2):248-58

Enomoto N, Ikejima K, Bradford B, et al. Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. Gastroenterology. 1998;115:443-51

Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Enomoto A, Nishiura T, Nishimura T, Brenner DA,

- Schemmer P, Bradford BU, Rivera CA, Zhong Z, Thurman RG. Kupffer cell-derived prostaglandin E(2) is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(1):G100-6
- Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, y col. Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25:51S-4S
- Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, Rollison DE, Salih HR, Krusch M, y col. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood* 2007;109:4816-24
- Erlich HA, Opelz G, Hansen J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity*. 2001 Apr;14(4):347-56
- European Liver Transplant Registry, 2013
- European Medicines Agency. Guideline on the development of medicinal products for the treatment of alcohol dependence. 2010
- Everhart JE, Beresford TP. Liver transplantation for alcoholic liver disease: a survey of transplantation programs in the United States. *Liver Transpl Surg*. 1997;3(3):220-6
- Ewald SJ, Shao H. Ethanol increases apoptotic cell death of thymocytes in vitro. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993;17(2):359-65
- Ewing JA. Detecting alcoholism. The cage questionnaire. *JAMA* 1984; 252 (14): 1905-7
- Falk C S, Steinle A, Schendel D J. Expression of HLA-C molecules confers target cell resistance to some non-major histocompatibility complex-restricted T cells in a manner analogous to allospecific natural killer cells. *J Exp Med*. 1995; 182:1005
- Farges O, Saliba F, Farhamant H, Samuel D, Bismuth A, Reynes M, Bismuth H. Incidence of rejection and infection after liver transplantation as function of the primary disease: possible influence of alcohol and polyclonal immunoglobulins. *Hepatology*. 1996;23(2):240-8
- Farges O, Saliba F, Farhamant H, Samuel D, Bismuth A, Reynes M, Bismuth H. Incidence of rejection and infection after liver transplantation as a function of the primary disease: possible influence of alcohol and polyclonal immunoglobulins. *Hepatology*. 1996;23(2):240-8

- Faure M, Long E O. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol.* 2002;168:6208
- Fehr C, Sander T, Tadic A, Lenzen KP, Anghelescu I, Klawe C, Dahmen N, Schmidt LG, Szegedi A. Confirmation of association of the GABRA2 gene with alcohol dependence by subtype-specific analysis. *Psychiatr Genet.* 2006;16(1):9-17
- Feldstein AE, Gores GJ. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci.* 2005; 1;10:3093-9
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology.* 2002 Mar;35(3):716-21
- Fox ES, Broitman SA, Thomas P. Bacterial endotoxins and the liver. *Lab Invest.* 1990;63(6):733-41
- Franco CC, Martínez JM, Bellido CB, Artacho GS, Gómez LM, Díez-Canedo JS, Aunión CD, Ruiz FJ, Bravo MA. Results of liver transplants from donors aged 70 plus: analysis of Andalusian transplant register. *Transplant Proc.* 2013;45(10):3647-9
- Freeman RB Jr, Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, Merion R, Wolfe R, Turcotte J, Teperman L; UNOS/OPTN Liver Disease Severity Score, UNOS/OPTN Liver and Intestine, and UNOS/OPTN Pediatric Transplantation Committees. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl.* 2002;8(9):851-8
- Freese DK, Snover DC, Sharp HL, Gross CR, Savick SK, Payne WD. Chronic rejection after liver transplantation: a study of clinical, histopathological and immunological features. *Hepatology.* 1991;13(5):882-91
- Frezza M, di Padova C, Pozzato G, et al. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N Engl J Med* 1990;322:95-9
- Friedman H. Alcohol effects on cytokine responses by immunocytes. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998;22(5 Suppl):184S-187S
- Friedman SL, Rockey DC, Bissell DM. Hepatic fibrosis 2006: report of the Third AASLD

- Single Topic Conference. Hepatology. 2007;45(1):242-9
- Friedman SL, Rockey DC, Bissell DM. Hepatic fibrosis 2006: report of the Third AASLD Single Topic Conference. Hepatology. 2007;45(1):242-9
- Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. Semin Liver Dis. 1999b;19(2):129-40
- Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2004 1(2):98-105
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. Gastroenterology. 2008;134(6):1655-69
- Friedman SL. Stellate cell activation in alcoholic fibrosis--an overview. Alcohol Clin Exp Res. 1999a;23(5):904-10
- Galperim B, Cheinquer H, Stein A, Fonseca A, Lunge V, Ikuta N. Prevalence of hepatitis C virus in alcoholic patients: role of parenteral risk factors. Arq Gastroenterol. 2006;43(2):81-4
- Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. Gastroenterology 2011;141:1572-85
- Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. Hepatology. 2008;47(2):729-36
- Gao B, Radaeva S. Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis. Biochim Biophys Acta. 2013;1832(7):1061-9
- Garcia-Iglesias T, Toro-Arreola A, Albarran-Somoza B, Toro-Arreola S, Sanchez-Hernandez PE, Ramirez-Dueñas MG, Balderas-Pena LM, Bravo-Cuellar A, Ortiz-Lazareno PC, Daneri-Navarro A. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. BMC Cancer 2009;9:186
- Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, Fisher RL, Conn HO, Atterbury CE, Glickman M. Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding. Hepatology. 1985;5(3):419-24
- Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, y col. Cells display major phenotypic and functional changes over the life span. Aging Cell 2010;9:527-35

- Gaskin FS, Kamada K, Yusof M, Korthuis RJ. 5'-AMP-activated protein kinase activation prevents postischemic leukocyte-endothelial cell adhesive interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 ;292(1):H326-32
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):311-35
- German JB, Walzem RL. The health benefits of wine. 2000; 20:561-93
- Germani G, Theocharidou E, Adam R, Karam V, Wendon J, O'Grady J, Burra P, Senzolo M, Mirza D, Castaing D, Klempnauer J, Pollard S, Paul A, Belghiti J, Tsochatzis E, Burroughs AK. Liver transplantation for acute liver failure in Europe: outcomes over 20 years from the ELTR database. *J Hepatol*. 2012 Aug;57(2):288-96
- Gil Grande L. [Blind liver biopsy in current medicine]. *Rev Clin Esp*. 2003;203(5):219-20
- Ginés P, Quintero E, Arroyo V, Terés J, Bruguera M, Rimola A, Caballería J, Rodés J, Rozman C. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology*. 1987 - ;7(1):122-8
- Girela E, Villanueva E, Hernandez-Cueto C, Luna JD. Comparison of the CAGE questionnaire versus some biochemical markers in the diagnosis of alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 1994;29(3):337-43
- Girouard L, Mandrekar P, Catalano D, Szabo G. Regulation of monocyte interleukin-12 production by acute alcohol: a role for inhibition by interleukin-10. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(1):211-6
- Gitto S, Micco L, Conti F, Andreone P, Bernardi M. Alcohol and viral hepatitis: a mini-review. *Dig Liver Dis*. 2009 ;41(1):67-70
- Glässner A, Eisenhardt M, Krämer B, Körner C, Coenen M, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Lab Invest*. 2012;92(7):967-77
- Goldberg BB, Goodman GA, Clearfield HR. Evaluation of ascites by ultrasound. *Radiology*. 1970 Jul;96(1):15-22
- Goldberg DM. Structural, functional, and clinical aspects of gamma-glutamyltransferase. *CRC*

Crit Rev Clin Lab Sci. 1980;12(1):1-58

Gourraud PA, Meenagh A, Cambon-Thomsen A, Middleton D. Linkage disequilibrium organization of the human KIR superlocus: implications for KIR data analyses. Immunogenetics. 2010;62(11-12):729-40

Greenfield NJ, Pietruszko R. Two aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. Biochim Biophys Acta. 1977 8;483(1):35-45

Gual A . Alcohol in Spain: is it different? 2006;101(8):1073-7

Guma M, Angulo A, Vilches C, Gomez-Lozano N, Malats N, Lopez-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. Blood 2004;104:3664–71

Guo J, Loke J, Zheng F, Hong F, Yea S, Fukata M, Tarocchi M, Abar OT, Huang H, Sninsky JJ, Friedman SL. Functional linkage of cirrhosis- predictive single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses. Hepatology. 2009;49(3):960-8

Gur C, Doron S, Kfir-Erenfeld S, Horwitz E, Abu-Tair L, Safadi R, Mandelboim O. NKp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis. Gut. 2012;61(6):885-93

Guyton A. C., Hall J. E. El hígado como órgano. En: Tratado de Fisiología médica. Undécima edición. Ed. Elsevier España, Madrid, España. pp. 859-864. 2007

Hadaya K, de Rham C, Bandelier C, Bandelier C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, Berney T, Buhler L, Kaiser L, Seebach JD, Tiercy JM, Martin PY, Villard J. Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation. Am J Transplant. 2008;8(12):2674-83

Hanck C, Manigold T, Böcker U, Kurimoto M, Kölbel CB, Singer MV, Rossol S. Gene expression of interleukin 18 in unstimulated peripheral blood mononuclear cells of patients with alcoholic cirrhosis. Gut. 2001;49(1):106-11

Hanvesakul R, Spencer N, Cook M, Gunson B, Hathaway M, Brown R, Nightingale P, Cockwell P, Hubscher SG, Adams DH, Moss P, Briggs D. Donor HLA-C genotype has a profound impact on the clinical outcome following liver transplantation. Am J

Transplant. 2008;8(9):1931-41

Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology*. 2002;36(5):1206-13

Hatton J, Burton A, Nash H, Munn E, Burgoyne L, Sheron N. Drinking patterns, dependency and life-time drinking history in alcohol-related liver disease. *Addiction*. 2009;104(4):587-92

Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician*. 2006; 1;74(5):756-62

Hernández-Guerra M, García-Pagán JC, Bosch J. Increased hepatic resistance: a new target in the pharmacologic therapy of portal hypertension. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(4 Suppl 2):S131-7

Higuchi S, Matsushita S, Murayama M, Takagi S, Hayashida M. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and the risk for alcoholism. *Am J Psychiatry*. 1995; 152(8):1219– 1221

Hill DB, Barve S, Joshi-Barve S, McClain C. Increased monocyte nuclear factor-kappaB activation and tumor necrosis factor production in alcoholic hepatitis. *J Lab Clin Med*. 2000;135(5):387-95

Hill DB, Marsano L, Cohen D, Allen J, Shedlofsky S, McClain CJ. Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. *J Lab Clin Med*. 1992;119(5):547 52

Hill DB, Marsano LS, McClain CJ. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 1993;18(3):576-80

Hill DB, Marsano LS, McClain CJ. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 1993;18:576-80. 21. McClain CJ, Cohen DA. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 1989;9:349-51

Hillbom M. Alcohol consumption and stroke: benefits and risks. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(7 Suppl):352S-358S

Hock B, Schwarz M, Domke I, Grunert VP, Wuertemberger M, Schiemann U, Horster

- S, Limmer C, Stecker G, Soyka M. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. *Addiction*. 2005;100(10):1477-86
- Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*. 2002;27(1):63-8
- Hoteit R, Bazarbachi A, Antar A, Salem Z, Shammaa D, Mahfouz R. KIR genotype distribution among patients with multiple myeloma: Higher prevalence of KIR 2DS4 and KIR 2DS5 genes. *Meta Gene*. 2014 Oct 9;2:730-6
- Hou L, Chen M, Ng J, Hurley CK. Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry. *Genes Immun*. 2012 Jan;13(1):47-58
- Hoyumpa AM Jr, Greene HL, Dunn GD, Schenker S. Fatty liver: biochemical and clinical considerations. *Am J Dig Dis*. 1975 ;20(12):1142-70
- Hui Zhang and Gary G. Exogenous IL-15 in Combination With IL-15R α Rescues Natural Killer Cells From Apoptosis Induced by Chronic Alcohol Consumption Meadows *Alcohol Clin Exp Res*. 2009 March ; 33(3): 419–427
- Hurley TD, Edenberg HJ. Genes encoding enzymes involved in ethanol metabolism. *Alcohol Res*. 2012;34(3):339-44
- Husain Z, Alper C A, Yunis E J, Dubey D P. Complex expression of natural killer receptor genes in single natural killer cells. *Immunology*. 2002; 106:373
- Imbert-Bismut F, Ratzu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T; MULTIVIRC Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*. 2001 7;357(9262):1069-75
- Infante-Rivard C, Esnaola S, Villeneuve JP. Clinical and statistical validity of conventional prognostic factors in predicting short-term survival among cirrhotics. *Hepatology*. 1987;7(4):660-4
- Immunobiología del trasplante. Estudios inmunológicos del donante y receptor del trasplante. Juan Carlos Ruiz San Millán, Manuel Arias Rodríguez, Marcos López Hoyos, José M.

Pastor Martínez. 2012

International figures on donation and transplantation—2008. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Transplant Newsletter 2009;14(1):23-35.

Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 2007;117(3):539-48

Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 2007; 117(3):539-48.

Iruzubieta P, Crespo J, Fábrega E. Long-term survival after liver transplantation for alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2013 Dec 28;19(48):9198-208

Jain A, DiMartini A, Kashyap R, Youk A, Rohal S, Fung J. Long-term follow-up after liver transplantation for alcoholic liver disease under tacrolimus. *Transplantation* 2000; 70(9):1335-1342

Jarcuska P, Veselíny E, Orolín M, Takácová V, Hancová M. [Spontaneous bacterial peritonitis in the patients with liver cirrhosis]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2004 ;10(6):265-70

Jareo PW, Preheim LC, Lister PD, Gentry MJ. The effect of ethanol ingestion on killing of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by rat neutrophils. *Alcohol Alcohol.* 1995;30(3):311-8

Jeong WI, Gao B. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008c;23 Suppl 1:S112-8

Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Bátakai S, Mukhopadhyay P, Horiguchi N, Harvey-White J, Marsicano G, Lutz B, Gao B, Kunos G. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab.* 2008b;7(3):227-35

Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2008a;134(1):248-58

Jeong WI, Park O, Radaeva S, Gao B. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology.* 2006;44(6):1441-51

- Jeong WIPO, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of NK cells/IFN-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2007
- Collier SD, Wu WJ, Pruett SB. Ethanol suppresses NK cell activation by polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) in female B6C3F1 mice: role of endogenous corticosterone. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24:291-9
- Jeong WIPO, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of NK cells/IFN-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2007
- Jerrells TR, Sibley D. Effects of ethanol on cellular immunity to facultative intracellular bacteria. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995;19(1):11-6
- Jerrells TR. Role of activated CD8+ T cells in the initiation and continuation of hepatic damage. *Alcohol*. 2002;27:47-52
- Jiang JJ, Dubois F, Driss F, Carnot F, Thepot V, Pol S, Berthelot P, Brechot C, Nalpas B. Clinical impact of drug addiction in alcoholics. *Alcohol Alcohol*. 1995 ;30(1):55-60
- Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, Simecek N, Noble J, Moffatt MF, Cookson WO, Trowsdale J, Traherne JA. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res*. 2012;22(10):1845-54
- Jiménez C, Marqués E, Loinaz C, Romano DR, Gómez R, Meneu JC, Hernández-Vallejo G, Alonso O, Abradelo M, Garcia I, Moreno E. Upper aerodigestive tract and lung tumors after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2003; 35(5):1900-1901
- Joly JG, Villeneuve JP, Mavrier P. Chronic ethanol administration induces a form of cytochrome P-450 with specific spectral and catalytic properties. *Alcohol Clin Exp Res*. 1977 ;1(1):17-20
- Jörnvall H, Hempel J, Vallee B. Structures of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Enzyme*. 1987;37(1-2):5-18
- Kamada K, Dayton CB, Yamaguchi T, Korthuis RJ. Antecedent ethanol ingestion prevents postischemic microvascular dysfunction. *Pathophysiology*. 2004;10(2):131-7
- Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL 2nd, Billiar TR. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide

- synthase. *Circulation*. 2000; 101(23):2742–8
- Karakucuk I, Dilly SA, Maxwell JD. Portal tract macrophages are increased in alcoholic liver disease. *Histopathology*. 1989;14(3):245-53
- Kendrick SF, O'Boyle G, Mann J, Zeybel M, Palmer J, Jones DE, Day CP. Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 2010;51(6):1988-97
- Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev*. 2006;214:186-201
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004; 305(5685):872-4
- Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JL. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology*. 1991;13(2):267-76
- Kiladjian JJ, Bourgeois E, Lobe I, Braun T, Visentin G, Bourhis JH, et al. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2006;20:463–70
- Kimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, Kiyohara C, Mitoma H, Uchino A, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5 with systemic lupus erythematosus and accompanying infections. *Rheumatol Oxf* 2010;49: 1346–53
- Kitson KE. Ethanol and acetaldehyde metabolism: past, present, and future. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20(8 Suppl):82A-92A
- Knecht KT, Adachi Y, Bradford BU, Iimuro Y, Kadiiska M, Xuang QH, Thurman RG. Free radical adducts in the bile of rats treated chronically with intragastric alcohol: inhibition by destruction of Kupffer cells. *Mol Pharmacol*. 1995;47(5):1028-34
- Knechtle SJ. Rejection of the liver transplant. *Semin Gastrointest Dis*. 1998;9(3):126-35
- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008;22;134(4):657-

- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008 Aug 22;134(4):657-67
- Krzeski P, Zych W, Kraszewska E, Milewski B, Butruk E, Habior A. Is serum bilirubin concentration the only valid prognostic marker in primary biliary cirrhosis? *Hepatology*. 1999;30(4):865-9
- Lands WEM. Cellular signals in alcohol-induced liver injury: a review. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995;19:928-38
- Laniel LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:225-74
- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:225-74
- Laso FJ, Iglesias-Osma C, Ciudad J, López A, Pastor I, Orfao A. Chronic alcoholism is associated with an imbalanced production of Th-1/Th-2 cytokines by peripheral blood T cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999;23(8):1306-11
- Laso FJ, Madruga JI, Girón JA, López A, Ciudad J, San Miguel JF, Alvarez-Mon M, Orfao A. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology*. 1997;25(5):1096-100
- Laso FJ, Madruga JI, López A, Ciudad J, Alvarez-Mon M, San Miguel J, Orfao A. Distribution of peripheral blood lymphoid subsets in alcoholic liver cirrhosis: influence of ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996b;20(9):1564-8
- Laso FJ, Madruga JI, López A, Ciudad J, Alvarez-Mon M, San Miguel J, Orfao A. Abnormalities of peripheral blood T lymphocytes and natural killer cells in alcoholic hepatitis persist after a 3-month withdrawal period. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(4):672-6
- Laso FJ, Madruga JI, San Miguel JF, Ciudad J, López A, Alvarez Mon M, Orfao A. Long lasting immunological effects of ethanol after withdrawal. *Cytometry*. 1996a 15;26(4):275-80
- Leevy CM. Fatty liver: a study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and review of the

- literature. *Medicine (Baltimore)*. 1962;41:249-76
- Lefkowitz JH. Morphology of alcoholic liver disease. 2005 ;9(1):37-53
- Legaz I, López-Álvarez MR, Campillo JA, Moya-Quiles MR, Bolarín JM, de la Peña J, Salgado G, Gimeno L, García-Alonso AM, Muro M, Miras M, Alonso C, Álvarez-López MR, Minguela A. KIR gene mismatching and KIR/C ligands in liver transplantation: consequences for short-term liver allograft injury. *Transplantation*. 2013; 27;95(8):1037-44
- Lelbach WK. Cirrhosis in the alcoholic and its relation to the volume of alcohol abuse. *Ann N Y Acad Sci*. 1975 25;252:85-105
- Lemster BH, Michel JJ, Montag DT, Paat JJ, Studenski SA, Newman AB, Vallejo AN. Induction of CD56 and TCR-independent activation of T cells with aging. *J Immunol* 2008;180:1979–90
- Lentine KL, Costa SP, Weir MR, Robb JF, Fleisher LA, Kasiske BL, Carithers RL, Ragosta M, Bolton K, Auerbach AD, Eagle KA; American Heart Association Council on the Kidney in Cardiovascular Disease and Council on Peripheral Vascular Disease. Cardiac disease evaluation and management among kidney and liver transplantation candidates: a scientific statement from the American Heart Association and the American College of Cardiology Foundation. *J Am Coll Cardiol*. 2012 31;60(5):434-80
- Levitsky J, Mailliard ME. Diagnosis and therapy of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. 2004;24(3):233-47
- Levitsky J, Mailliard ME. Diagnosis and therapy of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. 2004;24(3):233-47
- Li F, Cook RT, Alber C, Rasmussen W, Stapleton JT, Ballas ZK. Ethanol and natural killer cells. II. Stimulation of human natural killer activity by ethanol in vitro. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(6):981-7
- Lieber C. Metabolism of Alcohol *Clin Liver Dis* 2005; 9: 1-35
- Lieber CS, Gentry RT, Baraona E. First pass metabolism of ethanol. *Alcohol Alcohol Suppl*. 1994;2:163-9
- Lieber CS, Jones DP, Decarli LM. Effects of prolonged ethanol intake: Production of fatty liver

- despite adequate diets. *J Clin Invest.* 1965;44:1009-21
- Lieber CS. Alcohol liver injury: pathogenesis and therapy in 2001. *Pathol Biol.* 2001;49:738-52
- Lieber CS. Metabolism and metabolic effects of alcohol. *Med Clin North Am.* 1984 ;68(1):3-31
- Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 1-35
- Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23(6):991-1007
- Litten RZ, Allen JP, Fertig JB. Gamma-glutamyltranspeptidase and carbohydrate deficient transferrin: alternative measures of excessive alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995 ;19(6):1541-6
- Liu YK. Phagocytic capacity of RES in alcoholics. *J Reticuloendothel Soc.* 1979;25:605-13
- Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990;11(7):237-44
- Long E O, Rajagopalan S. HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors. *Semin Immunol.* 2000;12:101
- Long EO, Colonna M, Lanier LL. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: a standard nomenclature. *Immunol Today.* 1996;17(2):100
- López-Álvarez M. R., Moya-Quiles M. R., Minguela A., Gil J., Miras M., Campillo J. A., Díaz-Alderete A. M., García-Alonso A. M., Sánchez- Bueno F., Vicario J. L., Muro M., Álvarez-López M. R. HLA-C matching and liver transplants: donor-recipient genotypes influence early outcome and CD8⁺KIR2D⁺ T-cells recuperation. *Transplantation* 2009; 88:54-61
- Lovdal T, Andersen E, Brech A, Berg T. Fc receptor mediated endocytosis of small soluble immunoglobulin G immune complexes in Kupffer and endothelial cells from rat liver. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 18):3255-66
- Lu XL, Luo JY, Tao M, Gen Y, Zhao P, Zhao HL, Zhang XD, Dong N. Risk factors for alcoholic liver disease in China. *World J Gastroenterol.* 2004 15;10(16):2423-6

- Lucey MR, Schaubel DE, Guidinger MK, Tome S, Merion RM. Effect of alcoholic liver disease and hepatitis C infection on waiting list and posttransplant mortality and transplant survival benefit. *Hepatology*. 2009 Aug;50(2):400-6
- Luo X, Kranzler HR, Zuo L, Wang S, Blumberg HP, Gelernter J. CHRM2 gene predisposes to alcohol dependence, drug dependence and affective disorders: results from an extended case-control structured association study. *Hum Mol Genet*. 2005 15;14(16):2421-34
- Lutz CT, Moore MB, Bradley S, Shelton BJ, Lutgendorf SK. Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mech Ageing Dev* 2005;126:722–31
- Mackie J, Groves K, Hoyle A, Garcia C, Garcia R, Gunson B, Neuberger J. Orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease: a retrospective analysis of survival, recidivism, and risk factors predisposing to recidivism. *Liver Transpl*. 2001;7(5):418-27
- MacSween RN, Burt AD. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. 1986;6(3):221-32
- Maher JJ. Rat hepatocytes and Kupffer cells interact to produce interleukin-8 (CINC) in the setting of ethanol. *Am J Physiol*. 1995;269(4 Pt 1):G518-23.
- Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*. 2000;31(4):864-71
- Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, Vierling JM; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2010 Jun;51(6):2193-213
- Marques-Vidal P, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, Ferrières J, Ducimetière P. Different alcohol drinking and blood pressure relationships in France and Northern Ireland: The PRIME Study. *Hypertension*. 2001; 1;38(6):1361-6
- Marra F, Aleffi S, Galastri S, Provenzano A. Mononuclear cells in liver fibrosis. *Semin Immunopathol*. 2009;31(3):345-58
- Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens*.

2003 Jul;62(1):79-86

Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* 2002;31(4):429-34

Mattos ÂZ, Mattos AA, Sacco FK, Hoppe L, Oliveira DM. Analysis of the survival of cirrhotic patients enlisted for liver transplantation in the pre- and post-MELD era in southern Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2014 Jan-Mar;51(1):46-52

Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, Lombardo G, Kottlil S, Planta MA, y col. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15011–6

Maxwell LD, Ross OA, Curran MD, Rea IM, Middleton D. Investigation of KIR diversity in immunosenescence and longevity within the Irish population. *Exp Gerontol* 2004;39:1223–32

Mayans MV, Calvet X, Bruix J, Bruguera M, Costa J, Estève J, Bosch FX, Bru C, Rodés J. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Catalonia, Spain. *Int J Cancer.* 1990; 15;46(3):378-81

McCartney EM, Semendric L, Helbig KJ, Hinze S, Jones B, Weinman SA, Beard MR. Alcohol metabolism increases the replication of hepatitis C virus and attenuates the antiviral action of interferon. *J Infect Dis.* 2008; 15;198(12):1766-75

McClain C, Hill D, Schmidt J, Diehl AM. Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 1993;13(2):170-82

McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 1999;19(2):205-19

McClain CJ, Cohen DA. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology.* 1989;9(3):349-51

McGregor RR. Alcohol and immune defense. *JAMA.* 1986;256:1474-9

McMullen MR, Pritchard MT, Wang Q, Millward CA, Croniger CM, Nagy LE. Early growth response-1 transcription factor is essential for ethanol-induced fatty liver injury in mice. *Gastroenterology.* 2005;128(7):2066-76

- McQueen KL, Dorigi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P. Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol.* 2007;68(5):309-23
- McQueen KL, Parham P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(5):615-21
- McVicker BL, Tuma DJ, Kharbanda KK, y col. Effect of chronic ethanol administration on the in vitro production of proinflammatory cytokines by rat Kupffer cells in the presence of apoptotic cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31:122–9
- Mehlig K, Skoog I, Guo X, Schutze M, Gustafson D, Waern M, Ostling S, Bjorkelund C, Lissner L. Alcoholic beverages and incidence of dementia: 34-year follow-up of the prospective population study of women in Goteborg. *Am J Epidemiol.* 2008; 167(6):684–91
- Mejías D, Ramírez P, Ríos A, Munitiz V, Hernandez Q, Bueno F, Robles R, Torregrosa N, Miras M, Ortiz M, Barcia D, Parrilla P. Recurrence of alcoholism and quality of life in patients with alcoholic cirrhosis following liver transplantation. *Transplant Proc.* 1999;31(6):2472-4
- Mello T, Ceni E, Surrenti C, Galli A. Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. *Mol Aspects Med.* 2008;29(1-2):17-21
- Memoria de resultados. Registro español de Trasplante Hepático. 2012
- Mendenhall CL. Anabolic steroid therapy as an adjunct to diet in alcoholic hepatic steatosis. *Am J Dig Dis.* 1968;13(9):783-91
- Méndez-Sánchez N, Almeda-Valdés P, Uribe M. Alcoholic liver disease. An update. *Ann Hepatol.* 2005;4(1):32-42
- Mendoza J, Gómez-Domínguez E, Moreno-Otero R. Transient elastography (Fibroscan), a new non-invasive method to evaluate hepatic fibrosis. *Med Clin (Barc).* 2006 18;126(6):220-2
- Menon KV, Gores GJ, Shah VH. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic liver disease. *Mayo Clin Proc.* 2001;76(10):1021-9
- Meregalli M, Giacomini V, Lino S, Marchetti L, DeFeo T, Cappellini MD, Fiorelli G.

- Carbohydrate-deficient transferrin in alcohol and nonalcohol abusers with liver disease. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995 ;19(6):1525-7
- Merli M, Nicolini G, Angeloni S, Rinaldi V, De Santis A, Merkel C, Attili AF, Riggio O. Incidence and natural history of small esophageal varices in cirrhotic patients. *J Hepatol.* 2003;38(3):266-72
- Mezey E, Tobon F. Rates of ethanol clearance and activities of the ethanol-oxidizing enzymes in chronic alcoholic patients. *Gastroenterology.* 1971;61(5):707-15
- Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefrequencies.net>. *Tissue Antigens.* 2003 May;61(5):403-7
- Mingari M C, Ponte M, Cantoni C, Vitale C, Schiavetti F, Bertone S, Bellomo R, Cappai A T, Biassoni R. HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells. *Int Immunol.* 1997 ;9:485
- Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell* 2004;3:177–84
- Moesta AK, Parham P. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front Immunol.* 2012; 22;3:336
- Møller S, Bendtsen F, Henriksen JH. Pathophysiological basis of pharmacotherapy in the hepatorenal syndrome. *Scand J Gastroenterol.* 2005;40(5):491-500
- Monteiro E, Alves MP, Santos ML, Quintas I, Baptista A, Galvao-Teles A, Gavalier JS. Histocompatibility antigens: markers of susceptibility to and protection from alcoholic liver disease in a Portuguese population. *Hepatology.* 1988;8(3):455-8
- Monto A, Patel K, Bostrom A, Pianko S, Pockros P, McHutchison JG, Wright TL. Risks of a range of alcohol intake on hepatitis C-related fibrosis. *Hepatology.* 2004;39(3):826-34
- Moral Jiménez Mde L, Rodríguez Díaz FJ, Ovejero Bernal A, Sirvent Ruiz C. [Attitudinal changes and reduction of alcohol use in adolescents following a psychosocial intervention program]. *Adicciones.* 2009;21(3):207-19
- Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules

- in human natural killer cells. *J Exp Med*. 1995; 1;182(3):875-84
- Moretta A, Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Augugliaro R, Barbaresi M, Ciccone E, Moretta L. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med*. 1993; 1;178(2):597-604
- Moretta A. Molecular mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Cell*. 1997 Jul 11;90(1):13-8
- Morgan MY, Sherlock S. Sex-related differences among 100 patients with alcoholic liver disease. *Br Med J*. 1977 Apr 9;1(6066):939-41
- Morse RM, Hurt RD. Screening for alcoholism. *JAMA*. 1979; 14;242(24):2688-90
- Moschcowitz E. The pathogenesis of splenomegaly in hypertension of the portal circulation; congestive splenomegaly. *Medicine (Baltimore)*. 1948;27(2):187-221
- Moya- Quiles M. R., Muro M., Torío A., Sánchez- Bueno F., Miras M., Marín L., García-Alonso A. M., Parrilla P., Dausset J., Álvarez- López M. R. Human Leukocyte Antigen-C in short- and long-term liver graft acceptance. *Liver Transpl* 2003; 9(3):218-227
- Muhanna N, Abu Tair L, Doron S, Amer J, Azzeh M, Mahamid M, Friedman S, Safadi R. Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation. *Gut*. 2011;60(1):90-8
- Mukamal KJ, Chung H, Jenny NS, Kuller LH, Longstreth WT Jr, Mittleman MA, Burke GL, Cushman M, Beauchamp NJ Jr, Siscovick DS. Alcohol use and risk of ischemic stroke among older adults: the cardiovascular health study. *Stroke*. 2005; 36(9):1830-4
- Mukamal KJ, Chung H, Jenny NS, Kuller LH, Longstreth WT Jr, Mittleman MA, Burke GL, Cushman M, Psaty BM, Siscovick DS. Alcohol consumption and risk of coronary heart disease in older adults: the Cardiovascular Health Study. *J Am Geriatr Soc*. 2006; 54(1):30-7
- Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittleman MA, Camargo CA Jr, Stampfer MJ, Willett WC, Rimm EB. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *N Engl J Med*. 2003; 348(2):109-18.
- Mukherjee S, Sorrell MF. Noninvasive tests for liver fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2006;26(4):337-47

- Mulligan CJ, Robin RW, Osier MV, Sambuughin N, Goldfarb LG, Kittles RA, Hesselbrock D, Goldman D, Long JC. Allelic variation at alcohol metabolism genes (ADH1B, ADH1C, ALDH2) and alcohol dependence in an American Indian population. *Hum Genet.* 2003;113(4):325-36
- Murray KF, Carithers RL Jr; AASLD. AASLD practice guidelines: Evaluation of the patient for liver transplantation. *Hepatology.* 2005;41(6):1407-32
- Mutchnick MG, Lee HH. Impaired lymphocyte proliferative response to mitogen in alcoholic patients. Absence of a relation to liver disease activity. *Alcohol Clin Exp Res.* 1988;12(1):155-8
- Nagy LE, Diamond I, Gordon A. Cultured lymphocytes from alcoholic subjects have altered cAMP signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(18):6973-6
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. The physicians' guide to helping patients with alcohol problems. Washington, DC: Government Printing Office; 1995
- Nelson S, Kolls JK. Alcohol, host defense and society. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:205-9
- Neuberger J. Public and professional attitudes to transplanting alcoholic patients. 2007;13(11 Suppl 2):S65-8
- Neuberger J. Transplantation for alcoholic liver disease: a perspective from Europe. *Liver Transpl Surg.* 1998;4(5 Suppl 1):S51-7
- Neuman MG, Brenner DA, Rehmann B, Taieb J, Chollet-Martin S, Cohard M, y col. Mechanisms of alcoholic liver disease: cytokines. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25:251S-3S
- Neuman MG, Katz GG, Malkiewicz IM, Mathurin P, Tsukamoto H, Adachi M, Ishii H, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Casey CA. Alcoholic liver injury and apoptosis-synopsis of the symposium held at ESBRA 2001: 8th Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Paris, 2001. *Alcohol.* 2002;28(2):117-28
- Niemelä O, Juvonen T, Parkkila S. Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde-modified epitopes in human liver after alcohol consumption. *J Clin Invest.* 1991;87(4):1367-74
- Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL. Role of variability in explaining ethanol

pharmacokinetics: research and forensic applications. Clin Pharmacokinet. 2003;42(1):1-31

Norman P J, Stephens H A, Verity D H, Chandanayingyong D, Vaughan R W. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. Immunogenetics. 2001; 52:195

Notas G, Kisseleva T, Brenner D. NK and NKT cells in liver injury and fibrosis. Clin Immunol. 2009;130(1):16-26

Nowak I, Płoski R, Barcz E, Dziunycz P, Kamiński P, Kostrzewa G, Milewski Ł, Roszkowski PI, Senitzer D, Malejczyk J, Kuśnierczyk P. KIR2DS5 in the presence of HLA-C C2 protects against endometriosis. Immunogenetics. 2015;67(4):203-9

Nowak I, Płoski R, Barcz E, Dziunycz P, Kamiński P, Kostrzewa G, Milewski Ł, Roszkowski PI, Senitzer D, Malejczyk J, Kuśnierczyk P. KIR2DS5 in the presence of HLA-C C2 protects against endometriosis. Immunogenetics. 2015;67(4):203-9

Nure E, Frongillo F, Lirosi MC, Grossi U, Sganga G, Avolio AW, Siciliano M, Addolorato G, Mariano G, Agnes S. Incidence of upper aerodigestive tract cancer after liver transplantation for alcoholic cirrhosis: a 10-year experience in an Italian center. Transplant Proc. 2013; 45(7):2733-2735

O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ; Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease. Hepatology. 2010 ;51(1):307-28

Ohnishi K, Matsuo S, Matsutani K, Itahashi M, Kakihara K, Suzuki K, Ito S, Fujiwara K. Interferon therapy for chronic hepatitis C in habitual drinkers: comparison with chronic hepatitis C in infrequent drinkers. Am J Gastroenterol. 1996;91(7):1374-9

Okazaki T, Yoshihara H, Suzuki K, Yamada Y, Tsujimura T, Kawano K, Yamada Y, Abe H. Efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. Comparison between non-drinkers and drinkers. Scand J Gastroenterol. 1994;29(11):1039-43

OMS/Europe and the Global Information System on Alcohol and Health

OPTN and SRTR Annual data report, 2011 Adquisición y trasplante de órganos y Registro

científico de receptores de transplantes

Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la situación mundial, 2011

Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salamon R, Renaud S, Breteler MB. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol (Paris)*. 1997; 153(3):185–92

Orrego H, Blake JE, Blendis LM, Medline A. Prognosis of alcoholic cirrhosis in the presence and absence of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*. 1987 ;92(1):208-14

Ostapowicz G, Watson KJ, Locarnini SA, Desmond PV. Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1998;27(6):1730-5

Otani K, Korenaga M, Beard MR, Li K, Qian T, Showalter LA, Singh AK, Wang T, Weinman SA. Hepatitis C virus core protein, cytochrome P450 2E1, and alcohol produce combined mitochondrial injury and cytotoxicity in hepatoma cells. *Gastroenterology*. 2005 ;128(1):96-107

Pageaux GP, Bismuth M, Perney P, Costes V, Jaber S, Possoz P, Fabre JM, Navarro F, Blanc P, Domergue J, Eledjam JJ, Larrey D. Alcohol relapse after liver transplantation for alcoholic liver disease: does it matter? *J Hepatol*. 2003;38(5):629-34

Pageaux GP, Bismuth M, Perney P, Costes V, Jaber S, Possoz P, Fabre JM, Navarro F, Blanc P, Domergue J, Eledjam JJ, Larrey D. Alcohol relapse after liver transplantation for alcoholic liver disease: does it matter? *J Hepatol* 2003; 38(5): 629-634

Pageaux GP, Michel J, Coste V, Perney P, Possoz P, Perrigault PF, Navarro F, Fabre JM, Domergue J, Blanc P, Larrey D. Alcoholic cirrhosis is a good indication for liver transplantation, even for cases of recidivism. *Gut* 1999; 45(3): 421-426

Pan HN, Sun R, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30(9):1615-23

Pan HN, Sun R, Jaruga B, y col. Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30:1615–23

Parent LJ, Ehrlich R, Matis L, Singer DS. Ethanol: an enhancer of major histocompatibility

complex antigen expression. *FASEB J.* 1987;1(6):469-73

Parham P, Abi-Rached L, Matevosyan L, Moesta AK, Norman PJ, Older Aguilar AM, Guethlein LA. Primate-specific regulation of natural killer cells. *J Med Primatol* 2010;39:194–212

Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(2):108-22

Parham P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol.* 2005a;42(4):459-62

Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett.* 2004. 29; 92(1-2):11-3

Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005b; 5:201-214

Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol.* 2000;32(5):742-7

Parlesak A, Schafer C, Schutz T, y col. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol.* 2000;32:742

Pasqualetti P, Di Lauro G, Festuccia V, Giandomenico G, Casale R. Prognostic value of Pugh's modification of Child-Turcotte classification in patients with cirrhosis of the liver. *Panminerva Med.* 1992;34(2):65-8

Peck-Radosavljevic M. Hypersplenism. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13(4):317-23

Pende D, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Falco M, di Donato C, Accame L, Bottino C, Moretta A, Moretta L. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med.* 1996;184:505

Pereira SP, Howard LM, Muiesan P, Rela M, Heaton N, Williams R. Quality of life after liver transplantation for alcoholic liver disease. *Liver Transpl.* 2000;6(6):762-8

- Perez-Carceles MD, Medina MD, Perez-Flores D, Noguera JA, Pereniguez JE, Madrigal M, Luna A. Screening for hazardous drinking in migrant workers in southeastern Spain. *J Occup Health*. 2014 17;56(1):39-48
- Perney P, Portalès P, Corbeau P, Roques V, Blanc F, Clot J. Specific alteration of peripheral cytotoxic cell perforin expression in alcoholic patients: a possible role in alcohol-related diseases. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(11):1825-30
- Peters MG, Terrault NA. Alcohol use and hepatitis C. *Hepatology*. 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S220-5
- Petrasek J, Dolganiuc A, Csak T, Nath B, Hritz I, Kodys K, Catalano D, Kurt-Jones E, Mandrekar P, Szabo G. Interferon regulatory factor 3 and type I interferons are protective in alcoholic liver injury in mice by way of crosstalk of parenchymal and myeloid cells. *Hepatology*. 2011;53(2):649-60
- Pfitzmann R, Schwenzer J, Rayes N, Seehofer D, Neuhaus R, Nüssler NC. Long-term survival and predictors of relapse after orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease. *Liver Transpl*. 2007 Feb;13(2):197-205
- Pietra G, Semino C, Cagnoni F, Boni L, Cangemi G, Frumento G, Melioli G. Natural killer cells lyse autologous herpes simplex virus infected targets using cytolytic mechanisms distributed clonotypically. *J Med Virol*. 2000; 62:354
- Pinzani M, Macias-Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;4(4):459-72
- Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):397-416
- Pletcher MJ, Varosy P, Kiefe CI, Lewis CE, Sidney S, Hulley SB. Alcohol consumption, binge drinking, and early coronary calcification: findings from the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Epidemiol*. 2005 1;161(5):423-33
- Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997 22;349(9055):825-32

- Prelipcean CC, Fierbinteanu-Braticevici C, Drug VL, Lăcătușu C, Mihai B, Mihai C. [Liver cirrhosis--procoagulant stasis]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2011;115(3):678-85
- Pritchard MT, McMullen MR, Stavitsky AB, Cohen JI, Lin F, Medof ME, Nagy LE. Differential contributions of C3, C5, and decay-accelerating factor to ethanol-induced fatty liver in mice. *Gastroenterology*. 2007;132(3):1117-26
- Pruett SB, Fan R, Zheng Q. Acute ethanol administration profoundly alters poly I:C-induced cytokine expression in mice by a mechanism that is not dependent on corticosterone. *Life Sci*. 2003; 7;72(16):1825-39
- Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, William R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*. 1973;60(8):646-9
- Pyo CW, Guethlein LA, Vu Q, Wang R, Abi-Rached L, Norman PJ, Marsh SG, Miller JS, Parham P, Geraghty DE. Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. *PLoS One*. 2010 29;5(12):e15115
- Qamar AA, Grace ND, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Burroughs AK, Ripoll C, Maurer R, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Patch D, Matloff DS, Makuch R, Rendon G; Portal Hypertension Collaborative Group. Incidence, prevalence, and clinical significance of abnormal hematologic indices in compensated cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(6):689-95
- Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S54-62
- Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*. 2006;130(2):435-52
- Radaeva S, Wang L, Radaev S, Jeong WI, Park O, Gao B. Retinoic acid signaling sensitizes hepatic stellate cells to NK cell killing via upregulation of NK cell activating ligand RAE1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(4):G809-16
- Rajagopalan S, Long E O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*. 1999;189:1093

- Rajagopalan S, Long E O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*. 1999;189:1093
- Rajagopalan S., Fu J., Long E. O. Induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 2001; 167:1877-1881
- Rajalingam R. Variable interactions of recipient killer cell immunoglobulin-like receptors with self and allogenic human leukocyte antigen class I ligands may influence the outcome of solid organ transplants. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13(4):430-7
- Ramadori G. The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1991;61(3):147-58
- Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2009; 50:638–644
- Raulet D H, Vance R E, McMahon C W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:291
- Ray S, Khanra D, Sonthalia N, Kundu S, Biswas K, Talukdar A, Saha M, Bera H. Clinico-biochemical correlation to histological findings in alcoholic liver disease: a single centre study from eastern India. *J Clin Diagn Res*. 2014 Oct;8(10):MC01-5
- Registro Español de Trasplante hepático. 2013
- Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost Attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009 27;373(9682):2223-33
- Rehm J, Rehm MX, Shhield KD, Gmel G, Gual A. Alcohol consumption, alcohol dependence and related harms in Spain, and the effect of treatment-based interventions on alcohol dependence. *Adicciones*. 2013b;25(1):11-8
- Rehm J, Room R, Monteiro M, Gmel G, Graham K, Rehn N, Sempos CT, Jernigan D. Alcohol as a risk factor for global burden of disease. *Eur Addict Res*. 2003;9(4):157-64
- Rehm J, Room R, van den Brink W, Jacobi F. Alcohol use disorders in EU countries and Norway: an overview of the epidemiology.

2005;15(4):377-88

Rehm J, Shield KD, Gmel G, Rehm MX, Frick U. Modeling the impact of alcohol dependence on mortality burden and the effect of available treatment interventions in the European Union. 2013a ;23(2):89-97

Rehm, J., Shield, K., Rehm, M., Gmel, G.j., Frick, U. Alcohol consumption, alcohol dependence, and attributable burden of disease: potential gains from effective interventions for alcohol dependence. Centre for Addiction and Mental Health, Toronto, ON. 2012

Reich T, Edenberg HJ, Goate A, Williams JT, Rice JP, Van Eerdewegh P, Foroud T, Hesselbrock V, Schuckit MA, Bucholz K, Porjesz B, Li TK, Conneally PM, Nurnberger JI Jr, Tischfield JA, Crowe RR, Cloninger CR, Wu W, Shears S, Carr K, Crose C, Willig C, Begleiter H. Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *Am J Med Genet.* 1998; 8;81(3):207-15

Rigamonti C, Mottaran E, Reale E, Rolla R, Cipriani V, Capelli F, Boldorini R, Vidali M, Sartori M, Albano E. Moderate alcohol consumption increases oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38(1):42-9

Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR, Gabbiani G, Friedman SL. Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma. *Hepatology.* 1992;16(3):776-84

Rodríguez-Martos A. Intervención breve en un bebedor de riesgo desde la atención primaria de salud. *Trastornos Adictivos* 2005;7(4):197-210

Rogoff TM, Lipsky PE. Role of the Kupffer cells in local and systemic immune responses. *Gastroenterology.* 1981;80(4):854-60

Román J, Colell A, Blasco C, Caballeria J, Parés A, Rodés J, Fernández-Checa JC. Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HEP G2 cells: effect on transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Hepatology.* 1999 ;30(6):1473-80

Roman J, Colell A, Blasco C, Caballería J, Parés A, Rodés J, y col. Differential role of etanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HEP G2 cells: effect on transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *Hepatology.* 1999;30:1473-80

Roselle GA, Mendenhall CL, Chedid A, Moritz TE, Gartside P. Alcohol modulation of immune function: clinical and experimental data. Veterans Affairs Cooperative Study

- Groups 119 and 275. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995;19(3):551-4
- Rosman AS. Utility and evaluation of biochemical markers of alcohol consumption. *J Subst Abuse.* 1992;4(3):277-97
- Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Albumin synthesis. *Int Rev Physiol.* 1980;21:249-74
- Rothschild MA, Oratz M, Zimmon D, Schreiber SS, Weiner I, Van Caneghem A. Albumin synthesis in cirrhotic subjects with ascites studied with carbonate-14C. *J Clin Invest.* 1969;48(2):344-50
- Rowe IA, Webb K, Gunson BK, Mehta N, Haque S, Neuberger J. The impact of disease recurrence on graft survival following liver transplantation: a single centre experience. *Transpl Int.* 2008;21(5):459-65
- Rubín A, Sánchez-Montes C, Aguilera V, Juan FS, Ferrer I, Moya A, Montalva E, Pareja E, López-Andujar R, Prieto M, Berenguer M. Long-term outcome of 'long-term liver transplant survivors'. *Transpl Int.* 2013 Jul;26(7):740-50
- Rubín A, Sánchez-Montes C, Aguilera V, Juan FS, Ferrer I, Moya A, Montalva E, Pareja E, López-Andujar R, Prieto M, Berenguer M. Long-term outcome of 'long-term liver transplant survivors'. *Transpl Int.* 2013 Jul;26(7):740-50
- Ruppert K, Kuo S, DiMartini A, Balan V. In a 12- year study, sustainability of quality of life benefits after liver transplantation varies with pretransplantation diagnosis. *Gastroenterology.* 2010;139(5):1619-29, 1629.e1-4
- Safdar K, Schiff ER. Alcohol and hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 2004 ;24(3):305-15
- Sanchez Pardo L (2002) Consumo alcohólico en la población española. *Adicciones* 14, (1).
- Sawicki M W, Dimasi N, Natarajan K, Wang J, Margulies D H, Mariuzza R A. Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors. *Immunol Rev.* 2001; 181:52
- Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology.* 1988;8(5):1151-7
- Schuurman B, Heuff G, Beelen RH, Meyer S. Enhanced human Kupffer cell-mediated cytotoxicity after activation of the effector cells and modulation of the target cells by interferon-gamma: a mechanistic study at the cellular level. *Cell Immunol.* 1995;

1;165(1):141-7

Schwartz JM, Reinus JF. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease. 2012;16(4):659-66

Selvakumar A, Steffens U, Palanisamy N, Chaganti R S, Dupont B. Genomic organization and allelic polymorphism of the human killer cell inhibitory receptor gene KIR103. *Tissue Antigens*. 1997;49:564

Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc*. 2004;37(1):3-15

Seronello S, Sheikh MY, Choi J. Redox regulation of hepatitis C in nonalcoholic and alcoholic liver. *Free Radic Biol Med*. 2007; 15;43(6):869-82

Sherman KE, Rouster SD, Mendenhall C, Thee D. Hepatitis cRNA quasispecies complexity in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*. 1999;30(1):265-70

Shigeta Y, Nomura F, Iida S, Leo MA, Felder MR, Lieber CS. Ethanol metabolism in vivo by the microsomal ethanol-oxidizing system in deermice lacking alcohol dehydrogenase (ADH). *Biochem Pharmacol*. 1984 1;33(5):807-14

Shilling H G, Guethlein L A, Cheng N W, Gardiner C M, Rodriguez R, Tyan D, Parham P. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol*. 2002;168:2307(a)

Shilling H G, Young N, Guethlein L A, Cheng N W, Gardiner C M, Tyan D, Parham P. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol*. 2002;169:239(b)

Shiratori Y, Takada H, Hikiba Y, Nakata R, Okano K, Komatsu Y, Niwa Y, Matsumura M, Shiina S, Omata M, et al. Production of chemotactic factor, interleukin-8, from hepatocytes exposed to ethanol. *Hepatology*. 1993;18(6):1477-82

Shiratori Y, Takada H, Hikiba Y, Nakata R, Okano K, Komatsu Y, Niwa Y, Matsumura M, Shiina S, Omata M, et al. Production of chemotactic factor, interleukin-8, from hepatocytes exposed to ethanol. *Hepatology*. 1993;18(6):1477-82

Siegmund SV, Dooley S, Brenner DA. Molecular mechanisms of alcohol- induced hepatic fibrosis. *Dig Dis* 2005; 23: 264-74

Singal AK, Anand BS. Mechanisms of synergy between alcohol and hepatitis C virus. *J Clin*

Gastroenterol. 2007 Sep;41(8):761-72

Singal AK, Gudur P, Hmoud B, Kuo YF, Salameh H, Wiesner RH. Evolving frequency and outcomes of liver transplantation based on etiology of liver disease. Transplantation. 2013 Mar 15;95(5):755-60

Singal AK, Kuo YF, Anand BS. Hepatitis C virus infection in alcoholic hepatitis: prevalence patterns and impact on in-hospital mortality. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2012;24(10):1178-84

Singal AK, Sagi S, Kuo YF, Weinman S. Impact of hepatitis C virus infection on the course and outcome of patients with acute alcoholic hepatitis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2011 Mar;23(3):204-9

Singer DS, Parent LJ, Kolber MA. Ethanol: an enhancer of transplantation antigen expression. Alcohol Clin Exp Res. 1989;13(4):480-4

Siu L, Foont J, Wands JR. Hepatitis C virus and alcohol. Semin Liver Dis. 2009;29:188–199

Skude G, Wadstein J. Amylase, hepatic enzymes and bilirubin in serum of chronic alcoholics. Acta Med Scand. 1977 ;201(1-2):53-8

Skude G, Wadstein J. Amylase, hepatic enzymes and bilirubin in serum of chronic alcoholics. Acta Med Scand. 1977 ;201(1-2):53-8

Slukvin II, Jerrells TR. Different pathways of in vitro ethanol-induced apoptosis in thymocytes and splenic T and B lymphocytes. Immunopharmacology. 1995;31(1):43-57

Snover DC, Freese DK, Sharp HL, Bloomer JR, Najarian JS, Ascher NL. Liver allograft rejection. An analysis of the use of biopsy in determining outcome of rejection. Am J Surg Pathol. 1987;11(1):1-10

Sociedad Española de Trasplante Hepático. [Consensus document of the Spanish Society of Liver Transplantation]. Gastroenterol Hepatol. 2008;31(2):82-91

Song K, Coleman RA, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Mortari F, y col. Th1 cytokine response of CD57+ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease. Alcohol. 2001;24:155-67. Lieber CS. New concepts of the pathogenesis of alcoholic liver disease lead to novel treatments. Curr Gastroenterol Rep. 2004;6:60-5

Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain CJ. Advances in alcoholic liver disease. Curr

Gastroenterol Rep. 2004;6:71-6

Sophos NA, Pappa A, Ziegler TL, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chem Biol Interact.* 2001 Jan 30;130-132(1-3):323-37

Sorbi D, Boynton J, Lindor KD. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(4):1018-22

Sørensen TI, Orholm M, Bentsen KD, Høybye G, Eghøj K, Christoffersen P. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. *Lancet.* 1984 4;2(8397):241-4

Sozio M, Crabb DW. Alcohol and lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(1):E10-6

Sozio MS, Liangpunsakul S, Crabb D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(4):378-90

Stampfer MJ, Kang JH, Chen J, Cherry R, Grodstein F. Effects of moderate alcohol consumption on cognitive function in women. *N Engl J Med.* 2005; 352(3):245–53

Starzl TE, Van Thiel D, Tzakis AG, Iwatsuki S, Todo S, Marsh JW, Koneru B, Staschak S, Stieber A, Gordon RD. Orthotopic liver transplantation for alcoholic cirrhosis. *JAMA.* 1988 Nov 4;260(17):2542-4

Stern M, Carter EA, Walker WA. Food proteins and gut mucosal barrier. IV. Effects of acute and chronic ethanol administration on handling and uptake of bovine serum albumin by rat small intestine. *Dig Dis Sci.* 1986;31:1242–8

Stern M, Elsässer H, Hönger G, Steiger J, Schaub S, Hess C. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2008;8(6):1312-7

Sumeray MS, Rees DD, Yellon DM. Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(1):35–42

Sun AY, Ingelman-Sundberg M, Neve E, Matsumoto H, Nishitani Y, Minowa Y, y col. Ethanol and oxidative stress. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25:237S-43S

Sundstrom Y, Nilsson C, Lilja G, Karre K, Troye-Blomberg M, Berg L. The expression of

- human natural killer cell receptors in early life. *Scand J Immunol* 2007;66:335–44
- Svegliati-Baroni G, Baraona E, Rosman AS, Lieber CS. Collagen-acetaldehyde adducts in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Hepatology*. 1994;20(1 Pt 1):111-8
- Szabo G, Aloman C, Polyak SJ, Weinman SA, Wands J, Zakhari S. Hepatitis C infection and alcohol use: A dangerous mix for the liver and antiviral immunity. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30(4):709-19
- Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defense. *Alcohol Alcohol*. 1999;34:830-41
- Szabo G. Monocytes, alcohol use, and altered immunity. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(5 Suppl):216S-219S
- Takase S, Takada N, Sawada M, Tsutsumi M, Takada A. Relationship between alcoholic liver disease and HCV infection. *Alcohol Alcohol Suppl*. 1993;1A:77-84
- Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Pena J, Solana R. Increased expression ofNKcell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev* 2000;121:77–88
- Tatsukawa H, Fukaya Y, Frampton G, Martinez-Fuentes A, Suzuki K, Kuo TF, Nagatsuma K, Shimokado K, Okuno M, Wu J, Iismaa S, Matsuura T, Tsukamoto H, Zern MA, Graham RM, Kojima S. Role of transglutaminase 2 in liver injury via cross-linking and silencing of transcription factor Sp1. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1783-95
- Téllez-Avila FI, Chávez-Tapia NC, Torre-Delgadillo A. [Coagulation disorders in cirrhosis]. *Rev Invest Clin*. 2007;59(2):153-60
- Thomasson HR, Beard JD, Li T-K: ADH2 gene polymorphisms are determinants of alcohol pharmacokinetics. *Alcohol Clin Exp Res* 19:1495-1499, 1995
- Thornton AJ, Ham J, Kunkel SL. Kupffer cell-derived cytokines induce the synthesis of a leukocyte chemotactic peptide, interleukin-8, in human hepatoma and primary hepatocyte cultures. *Hepatology*. 1991;14(6):1112-22
- Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2000;16;343(20):1467-76

- Tome S, Lucey MR. Timing of liver transplantation in alcoholic cirrhosis. *J Hepatol.* 2003;39(3):302-7
- Triger DR, Wright R. Hyperglobulinaemia in liver disease. *Lancet.* 1973 30;1(7818):1494-6
- Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity.* 2001;15:363
- Tsui JJ, Pletcher MJ, Vittinghoff E, Seal K, Gonzales R. Hepatitis C and hospital outcomes in patients admitted with alcohol-related problems. *J Hepatol.* 2006;44(2):262-6
- Uhrberg M, Valiante N M, Shum B P, Shilling H G, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier L L, Parham P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 1997;7:753
- Uhrberg M, Valiante N M, Young N T, Lanier L L, Phillips J H, Parham P. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol.* 2001; 166:3923
- United Network for Organ Sharing. <http://www.unos.org>
- Valiante N M, Uhrberg M, Shilling H G, Lienert-Weidenbach K, Arnett K L, D'Andrea A, Phillips J H, Lanier L L, Parham P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity.* 1997;7:739
- Valiante N. M., Uhrberg M., Shilling H. G., Lienert-Weidenbach K., Arnett K. L., D'Andrea A., Phillips J. H., Lanier L. L., Parham, P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; 7:739-751
- Van Gerven NM, Verwer BJ, Witte BI, van Erpecum KJ, van Buuren HR, Maijers I, Visscher AP, Verschuren EC, van Hoek B, Coenraad MJ, Beuers UH, de Man RA, Drenth JP, den Ouden JW, Verdonk RC, Koek GH, Brouwer JT, Guichelaar MM, Vrolijk JM, Mulder CJ, van Nieuwkerk CM, Bouma G; Dutch Autoimmune hepatitis STUDY group. Epidemiology and clinical characteristics of autoimmune hepatitis in the Netherlands. *Scand J Gastroenterol.* 2014 Oct;49(10):1245-54
- Vanderkerken K, Bouwens L, De Neve W, Van den Berg K, Baekeland M, Delens N, Wisse E. Origin and differentiation of hepatic natural killer cells (pit cells). *Hepatology.*

1993;18(4):919-25

Vasanthi HR, Parameswari RP, DeLeiris J, Das DK. Health benefits of wine and alcohol from neuroprotection to heart health. 2012 1;4:1505-12

Vasiliou V, Nebert DW. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics*. 2005 Jun;2(2):138-43

Vera M, Nieto N. Hepatic stellate cells and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2006;98(9):674-84

Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* 2004;18:2002–7

Vilches C, Castaño J, Gómez-Lozano N, Estefanía E. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens*. 2007 Nov;70(5):415-22

Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:217-51

Vilches C., Pando M. C., Parham P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D0 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* 2000; 51:639-646 (a).

Vilches C., Rajalingam R., Uhrberg M., Gardiner C. M., Young N. T., Parham P. KIR2DL5, a novel Killer-Cell Receptor with a D0-D2 configuration of Ig-Like domains. *J Immunol* 2000; 164:5797–5804 (b)

Villard J. The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation. *J Innate Immun*. 2011;3(4):395-402

Vince AJ, Burridge SM. Ammonia production by intestinal bacteria: the effects of lactose, lactulose and glucose. *J Med Microbiol*. 1980;13(2):177-9

Waltenbaugh C, Vasquez K, Peterson JD. Alcohol consumption alters antigen-specific Th1 responses: mechanisms of deficit and repair. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(5 Suppl):220S-223S

Wan YJ, Poland RE, Lin KM. Genetic polymorphism of CYP2E1, ADH2, and ALDH2 in

- Mexican-Americans. *Genet Test*. 1998;2(1):79-83
- Wang JC, Hinrichs AL, Stock H, Budde J, Allen R, Bertelsen S, Kwon JM, Wu W, Dick DM, Rice J, Jones K, Nurnberger JI Jr, Tischfield J, Porjesz B, Edenberg HJ, Hesselbrock V, Crowe R, Schuckit M, Begleiter H, Reich T, Goate AM, Bierut LJ. Evidence of common and specific genetic effects: association of the muscarinic acetylcholine receptor M2 (CHRM2) gene with alcohol dependence and major depressive syndrome. *Hum Mol Genet*. 2004 1;13(17):1903-11
- Watson RR, Borgs P, Witte M, McCuskey RS, Lantz C, Johnson MI, Mufti SI, Earnest DL. Alcohol, immunomodulation, and disease. *Alcohol Alcohol*. 1994;29(2):131-9
- Watson RR, Jackson JC, Hartmann B, Sampliner R, Mobley D, Eskelson C. Cellular immune functions, endorphins, and alcohol consumption in males. *Alcohol Clin Exp Res*. 1985;9(3):248-54
- Wechsler H, Austin SB. Binge drinking: the five/four measure. *J Stud Alcohol*. 1998 ;59(1):122-4
- Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mamm Genome*. 1999;10:154
- Wende H, Volz A, Ziegler A. Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster. *Immunogenetics*. 2000;51:703
- Wheeler M, Endotoxin and Kupffer Cell Activation in alcoholic Liver Disease. *Alcohol Research and Health* 2003; 27:300-306
- Wheeler MD, Thurman RG. Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway. *J Biol Chem*. 2003;278:8435-41
- Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2001 Sep;2(9):777-80
- Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R; United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003 ;124(1):91-6
- Wiesner RH, Batts KP, Krom RA. Evolving concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of chronic hepatic allograft rejection. *Liver Transpl Surg*. 1999;5(5):388-400

- Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, Edwards EB, Malinchoc M, Kremers WK, Krom RA, Kim WR. MELD and PELD: application of survival models to liver allocation. *Liver Transpl.* 2001;7(7):567-80
- Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S, Trowsdale J. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000a; 25;97(9):4778-83
- Wilson MJ, Torkar M, Trowsdale J. Genetic analysis of a highly homologous gene family. The killer cell immunoglobulin-like receptors. *Methods Mol Biol.* 2000b;121:251-63
- Winter C C, Long E O. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol.* 1997; 158:4026
- Witt C S, Dewing C, Sayer D C, Uhrberg M, Parham P, Christiansen F T. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation.* 1999; 68:1784
- Worner TM, Lieber CS. Perivenular fibrosis as precursor lesion of cirrhosis. *JAMA.* 1985; 2;254(5):627-30
- Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 277-84
- www.allelefrequencies.net
- www.eltr.org.
- www.ustransplant.org.
- Xie YD, Feng B, Gao Y, Wei L. Characteristics of alcoholic liver disease and predictive factors for mortality of patients with alcoholic cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2013 Dec;12(6):594-601
- Yamauchi M, Nakahara M, Maezawa Y, Satoh S, Nishikawa F, Ohata M, Mizuhara Y, Hirakawa J, Nakajima H, Fujisawa K, et al. Prevalence of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis and prior exposure to hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 1993 ;88(1):39-43
- Yan AW, Fouts DE, Brandl J, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of

- alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2011; 53:96–105
- Yawata M, Yawata N, Abi-Rached L, Parham P. Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit Rev Immunol*. 2002;22(5-6):463-82
- Yee HF, Lidofsky SD. Acute liver failure. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, eds. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, 2002:1567-74.
- Yin SJ, Bosron WF, Li TK, Ohnishi K, Okuda K, Ishii H, Tsuchiya M. Polymorphism of human liver alcohol dehydrogenase: identification of ADH2 2-1 and ADH2 2-2 phenotypes in the Japanese by isoelectric focusing. *Biochem Genet*. 1984 ;22(1-2):169-80
- Younossi ZM, Zheng L, Stepanova M, Venkatesan C, Mir HM. Moderate, excessive or heavy alcohol consumption: each is significantly associated with increased mortality in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(7):703-9
- Yusoff IF, House AK, De Boer WB, Ferguson J, Garas G, Heath D, Mitchell A, Jeffrey Gp. Disease recurrence after liver transplantation in Western Australia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(2):203-7
- Zaia JA, Sun JY, Gallez-Hawkins GM, Thao L, Oki A, Lacey SF, Dagis A, Palmer J, Diamond DJ, Forman SJ, Senitzer D. The effect of single and combined activating killer immunoglobulin-like receptor genotypes on cytomegalovirus infection and immunity after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(3):315-25
- Zetterman RK, Sorrell MF. Immunologic aspects of alcoholic liver disease. *Gastroenterology*. 1981;81(3):616-24
- Zhang H, Meadows GG. Chronic alcohol consumption perturbs the balance between thymus-derived and bone marrow-derived natural killer cells in the spleen. *J Leukoc Biol*. 2008;83(1):41-7
- Zhang T, Li Y, Lai JP, Douglas SD, Metzger DS, O'Brien CP, Ho WZ. Alcohol potentiates hepatitis C virus replicon expression. *Hepatology*. 2003;38(1):57-65
- Zhao XJ, Dong Q, Bindas J, Piganelli JD, Magill A, Reiser J, Kolls JK. TRIF and IRF-3

binding to the TNF promoter results in macrophage TNF dysregulation and steatosis induced by chronic ethanol. *J Immunol.* 2008; 1;181(5):3049-56

Zhou Z, Sun X, Kang YJ. Ethanol-induced apoptosis in mouse liver: Fas- and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *Am J Pathol.* 2001;159(1):329-38

Zoli M, Merkel C, Magalotti D, Gueli C, Grimaldi M, Gatta A, Bernardi M. Natural history of cirrhotic patients with small esophageal varices: a prospective study. *Am J Gastroenterol.* 2000 ;95(2):503-8

Zwiebel WJ. Sonographic diagnosis of hepatic vascular disorders. *Semin Ultrasound CT MR.* 1995;16(1):34-48