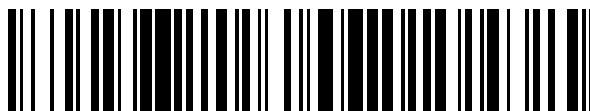


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 809**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2007** **E 07824351 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015** **EP 2069781**

54 Título: **Pronóstico de cirrosis hepática alcohólica**

30 Prioridad:

27.10.2006 GB 0621454

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.03.2016

73 Titular/es:

UCL BUSINESS PLC (100.0%)
The Network Building 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB

72 Inventor/es:

JALAN, RAJIV;
MOOKERJEE, RAJESHWAR P.;
STADLBAUER, VANESSA y
DAVIES, NATHAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 564 809 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Pronóstico de cirrosis hepática alcohólica

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método para evaluar la función hepática, en particular para predecir el resultado clínico de cirrosis alcohólica.

10 Antecedentes de la invención

Los datos de un registro europeo de insuficiencia hepática sugieren que la incidencia de enfermedad hepática está aumentando con aproximadamente 1 millón de pacientes en la actualidad con insuficiencia hepática en Europa occidental, una proporción significativa secundaria al alcohol. En la mayoría de los pacientes, la insuficiencia hepática es el resultado de un suceso causante tal como infección o hepatitis alcohólica en los antecedentes de enfermedad hepática crónica establecida; una entidad que se denomina "insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF)". Una vez establecida la insuficiencia hepática, los tratamientos específicos se limitan a apoyo orgánico y las tasas de mortalidad se aproximan a un 50 %. En pacientes con ACLF secundaria a hepatitis alcohólica grave (AH), se cree que aproximadamente un 40 % de las muertes son el resultado de sepsis.

Fujimoto *et al.*, (Alcohol Clin Exp Res, 24: 48S-54S, 2000) informa de una evaluación de niveles de endotoxina en plasma y concentraciones en suero de citoquinas y proteína de unión a lipopolisacárido durante la fase aguda y de recuperación de pacientes con hepatitis alcohólica. La Patente de Estados Unidos N.º 5.998.389 describe ensayos para endotoxina y en particular métodos para reducir el número de falsos positivos en un ensayo de endotoxina debido a una vía enzimática sensible a glucano en un lisado de amebocitos. El documento WO 2004/071645 describe métodos para usó en la determinación de si un paciente se puede beneficiar del tratamiento con un antagonista del receptor 4 de tipo toll, tal como un compuesto de antiendotoxina. El documento de Patente US 2004/0228829 describe un dispositivo para eliminar toxinas de la sangre de pacientes que parecen insuficiencia hepática aguda. El documento WO 96/41183 describe métodos y kits para el pronóstico de colitis ulcerosa, colangitis esclerosante primaria y el tipo 1 de la hepatitis autoinmune. Rolando *et al.*, (European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 12: páginas 1135-1140, 2000) informa que la fagocitosis se reduce en neutrófilos de pacientes con insuficiencia hepática aguda en comparación con los pacientes de control.

Sumario de la invención

Los inventores examinaron pacientes con enfermedad hepática alcohólica y han descubierto un factor humoral, presente en plasma, que destruye la función inmune en tales pacientes. La eliminación de endotoxinas conduce a la restauración de la función, lo que sugiere que el factor humoral es una molécula de tipo endotoxina. La detección de esta molécula de tipo endotoxina en esos pacientes se puede usar para evaluar su diagnóstico clínico, en particular, riesgo de infección, riesgo de mortalidad, riesgo de insuficiencia orgánica y la probabilidad de respuesta a terapias convencionales tales como tratamiento con inmunosupresores.

Los inventores han establecido que el factor humoral es capaz de estimular la activación de neutrófilos. La presencia de la molécula de tipo endotoxina se puede determinar mediante la evaluación de la función de los neutrófilos del individuo. En consecuencia, la función anómala de los neutrófilos, tal como activación de neutrófilos o disminución de la capacidad fagocítica de neutrófilos, representan importantes marcadores biológicos importantes de resultado nocivo de insuficiencia hepática. Estos marcadores se pueden usar como un indicador fiable de progresión y resultado en pacientes con insuficiencia hepática. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención se proporciona un método para evaluar el pronóstico de un individuo que padece cirrosis alcohólica, método que comprende

(a)

(i) poner en contacto una muestra de plasma de dicho individuo con una población de neutrófilos normales que no son de dicho individuo para producir una población de ensayo de neutrófilos y

(ii) proporcionar una muestra de control que comprende una población de neutrófilos normales que no son de dicho individuo en el que dicha muestra de control no se pone en contacto con dicha muestra de plasma,

(b) evaluar la capacidad de fagocitosis de la población de ensayo de neutrófilos de (a)(i),

(c) comparar dicha capacidad de fagocitosis de (b) con la capacidad de fagocitosis de dicha muestra de control de neutrófilos de (a)(ii),

en el que un nivel más bajo de fagocitosis de neutrófilos en dicha población de ensayo, en comparación con el nivel de fagocitosis de neutrófilos en dicha muestra de control es indicativo de un pronóstico de infección y/o insuficiencia orgánica y/o mortalidad.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representaciones de análisis de FACS representativas para Phagotest® y Bursttest®. (A) Los neutrófilos se seleccionaron de acuerdo con sus características de dispersión directa y lateral. (B) Análisis de fagocitosis: En una muestra sin marcadores bacterianos se establece que más de un 99 % de los neutrófilos seleccionados están dentro del primer marcador. (C) Representación de FACS representativa de un paciente con estallido oxidativo en reposo elevado. Se mide el porcentaje de dobles positivos (células positivas para CD16 que producen metabolitos reactivos de oxígeno determinadas con fluorescencia de color verde en FL-1). (D) Representación de FACS correspondiente de un paciente con una media geométrica de intensidad de fluorescencia muy baja (GMFI) (E) Representación de FACS representativa de un paciente con estallido oxidativo en reposo bajo. (F) Representación de FACS correspondiente de un paciente con GMFI baja. (G) Representación de FACS representativa de un sujeto de control sano. (H) Representación de FACS correspondiente de un control sano con GMFI normal.

Figura 2: Estallido oxidativo en reposo, estallido oxidativo después de estimulación con fMLP o *E. coli* y GMFI relativa para controles, pacientes con cirrosis alcohólica y cirrosis + AH. * Significativo con respecto al control. § Significativo con respecto al control y cirrosis.

Figura 3: (A) Análisis de tiempo para infección (Kaplan-Meier) para pacientes con estallido en reposo elevado frente a bajo. (B) Curva de supervivencia de Kaplan Meier y análisis de rango logarítmico para pacientes con sin infección positiva del cultivo.

Figura 4: (A) Área bajo la curva de funcionamiento del receptor para determinar la utilidad predictiva de la medida del estallido oxidativo para determinar la supervivencia. Un punto de corte de estallido en reposo < 55 % tenía una sensibilidad de un 75 % y una especificidad de un 64 % para predicción de muerte. Área = 0,77; Error Estd. = 0,07; significancia = 0,003; punto de corte = 55; sensibilidad = 0,77; especificidad = 0,69. (B) Curva de supervivencia de Kaplan Meier y análisis de rango logarítmico para pacientes estratificados para estallido oxidativo en reposo elevado (>= 55 %) o bajo (< 55 %).

Día	20	40	60	80
Sucesos	4	5	10	12
En riesgo	50	44	36	33

Figura 5: (A) Área bajo la curva de funcionamiento del receptor para determinar la utilidad predictiva de la medida de la media geométrica de intensidad de fluorescencia (GMFI) en para determinar la supervivencia. Un punto de corte de GMFI < 295 % tenía una sensibilidad de un 86 % y una especificidad de un 76 % para predicción de muerte. Área = 0,80; Error Estd. = 0,08; significancia = 0,002; punto de corte = 42; sensibilidad = 0,86; especificidad = 0,70. (B) Curva de supervivencia de Kaplan Meier y análisis de rango logarítmico para pacientes estratificados para GMFI baja (< 295) o elevada (>= 295).

Día	20	40	60	80
Sucesos	4	4	5	5
En riesgo	29	29	26	24

Figura 6: Estallido oxidativo en reposo en sangre completa de pacientes y en neutrófilos normales incubados con plasma de pacientes. El plasma de pacientes con estallido elevado también inducía un estallido elevado en neutrófilos normales, mientras que el plasma de pacientes con estallido en reposo bajo no lo hacían. WB sangre completa, NN neutrófilos normales, PP plasma de pacientes, H estallido en reposo elevado (>= 55 %), L estallido en reposo bajo (< 55 %). * p = 0,002 con respecto a normal. ** p = 0,0005 con respecto a normal.

Figura 7: Capacidad de inversión del estallido oxidativo en reposo por incubación de neutrófilos de pacientes con plasma normal. PN neutrófilos de paciente, PP plasma de paciente, NP plasma normal.

Figura 8: Influencia del plasma en fagocitosis. Los neutrófilos de paciente incubados en su propio plasma mostraron disminución de fagocitosis. La incubación de neutrófilos normales con plasma de pacientes con estallido en reposo bajo no cambia la fagocitosis, del plasma de pacientes con estallido elevado disminuye la fagocitosis. La incubación de neutrófilos de paciente con plasma normal restablece la función fagocítica. PN neutrófilos de paciente, PP plasma de paciente, NN neutrófilos normales, NP plasma normal, H estallido en reposo elevado, L estallido en reposo bajo.

Figura 9: Aumento dependiente de la dosis en estallido en reposo a través de incubación con endotoxina. * p < 0,05; ** p < 0,001.

Figura 10: La incubación con endotoxina no cambia la fagocitosis en neutrófilos normales pero disminuye la fagocitosis en neutrófilos de pacientes.

Figura 11: El estallido oxidativo en reposo es reversible pasando plasma sobre una columna de eliminación de endotoxinas o incubación con anticuerpos CD14. Las columnas o los anticuerpos CD14 no influyen en el estallido en reposo cuando se usa plasma de pacientes con estallido bajo o plasma de control. NN + PP H con respecto a NN + PP H CD14 p < 0,001. NN + PP H con respecto a NN + PP H Columna p < 0,001.

Figura 12: la disminución de la fagocitosis es reversible pasando plasma sobre una columna de eliminación de

endotoxinas o incubación con anticuerpos CD14. Las columnas o los anticuerpos CD14 no influyen en el estallido en reposo cuando se usa plasma de pacientes con estallido bajo o plasma de control. NN + PP H con respecto a NN + PP H CD14 $p = 0,004$ NN + PP H con respecto a NN + PP H Columna $p = 0,03$.

Figura 13: muestra la relación entre estallido en reposo de neutrófilos (%) y actividad de mieloperoxidasa (MPO) en plasma (sin células), expresada en unidades de guayacol $\times 10^{-3}$ (mGU) por mililitro de plasma en 10 pacientes con gravedad variable de enfermedad hepática. Se indica el ajuste mediante regresión lineal, mostrando una relación significativa entre estas dos medidas ($p = 0,0075$, $r^2 = 0,66$). Los dos sujetos que posteriormente murieron se indican con símbolos huecos.

10 Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que el término "comprender", o variaciones tales como "comprendido" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no se debería tomar como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esa técnica anterior forma parte del conocimiento general en Australia o en otro lugar.

Las estrategias actuales para el tratamiento de la hepatitis alcohólica incluyen administración de agentes inmunosupresores tales como esteroides y más recientemente se han usado estrategias anti-TNF. Los datos para el uso de estos fármacos en hepatitis alcohólica son contradictorios y, aunque los esteroides se usan ampliamente, existe una heterogeneidad considerable en los resultados de los ensayos clínicos existentes. De forma análoga, se ha demostrado que el uso de estrategias anti-TNF en la hepatitis alcohólica en pacientes tiene un efecto positivo en algunos estudios mientras que el aumento del riesgo de infección (y mortalidad) ha dado como resultado la detención del ensayo clínico en otros estudios.

Por lo tanto, existe una necesidad de identificar qué pacientes van a responder probablemente a qué tratamientos terapéuticos. Hay una necesidad particular de identificar si algunos pacientes en particular presentan riesgo de infección más elevado, insuficiencia orgánica y/o mortalidad y si algunos reglamentos en particular pueden aumentar estos riesgos.

Los inventores han determinado que la detección o medición de endotoxina o actividad de endotoxina en plasma o sangre completa de pacientes con enfermedad hepática permite la clasificación de esos pacientes en grupos de riesgo bajo o riesgo elevado. Esto permite la predicción del pronóstico de un paciente. En particular, esto permite la determinación del riesgo relativo de mortalidad, riesgo de infección y el riesgo de insuficiencia orgánica en pacientes con insuficiencia hepática. La evaluación de endotoxinas o la actividad de endotoxina o también puede ayudar a definir la asignación a una terapia específica. Esto se puede usar para determinar si un paciente se debe tratar con, por ejemplo, antibióticos, corticosteroides, anti-TNF o terapia extracorpórea. Esto también se puede usar para predecir si es probable que dichas terapias conduzcan a efectos secundarios no deseados, tales como un aumento del riesgo de infección. Esta información la puede usar un médico con el fin de tomar una decisión clínica en cuanto a la mejor manera de tratar un paciente individual.

Los inventores han demostrado que el uso de tales medidas actúa como un indicador fiable de los resultados en pacientes con hepatitis alcohólica grave. Se cree que la aplicación de un ensayo como se describe en el presente documento ayuda a definir aquellos pacientes en los que el tratamiento con agentes inmunosupresores, tales como estrategias con esteroides o anti-TNF será eficaz. Esto también ayudará a definir a otros pacientes en los que tales terapias con inmunosupresores pueden conducir a un aumento del riesgo de infección. También se cree que la aplicación de este ensayo ayuda a definir a los pacientes con insuficiencia hepática progresiva en los que se justifica la intervención temprana con los sistemas de soporte hepático, en comparación con las puntuaciones de pronóstico disponibles en la actualidad (DF, MELD, Child-Pugh). Su uso también se puede ampliar a una población de pacientes que esperan un trasplante para estratificar la utilización de órganos para trasplante o para determinar la función del órgano después del trasplante hepático ortotópico.

La presencia del factor humoral de tipo endotoxina se puede evaluar mediante la detección del factor de forma directa, por ejemplo mediante la detección de la presencia de endotoxina, o se puede evaluar mediante la detección del factor de forma indirecta. Por ejemplo, un método puede comprender la detección de actividad de endotoxina como un indicador de la presencia de tal factor humoral, o la detección de un efecto corriente abajo causado por la presencia del factor humoral.

En todo este documento, las expresiones factor humoral, factor transmisible, factor de tipo endotoxina y endotoxina se usan indistintamente para describir el factor identificado en los Ejemplos en pacientes que tienen una enfermedad hepática. Estos términos pretenden hacer referencia a un factor que se puede encontrar en la sangre o plasma de tales pacientes, que es transmisible y que tiene actividad de endotoxina.

El factor humoral se puede transmitir en plasma. Es decir, la activación de neutrófilos se puede causar en una población de neutrófilos normales por exposición a plasma que ha estado en contacto con una población de neutrófilos activados. Por ejemplo, como se demuestra en los Ejemplos, el factor humoral puede causar la activación de los neutrófilos que no se activaron previamente. Por lo tanto, un método para detectar endotoxina (factor humoral) puede implicar la puesta en contacto del plasma del individuo con una muestra de neutrófilos normales no de ese individuo y determinar si esto causa una función anómala, tal como activación, en esos neutrófilos. Los neutrófilos pueden ser cualquier muestra de neutrófilos normales como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los neutrófilos pueden ser de un individuo que no tiene insuficiencia hepática, pueden ser de una población de neutrófilos que han sometido a ensayo con anterioridad y que han demostrado tener una función normal, por ejemplo muestra que no se van a activar, o pueden ser de una línea celular de neutrófilos. Alguna función de los neutrófilos, tal como activación de neutrófilos se puede medir con cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento, por ejemplo mediante la evaluación de estallido oxidativo o niveles de MPO. Tal ensayo se puede realizar en una muestra de plasma del individuo y se puede realizar *in vitro*.

La presencia de un factor en el plasma de un individuo que padece insuficiencia hepática, factor que es capaz de activar los neutrófilos, es indicativo de que el propio individuo ha activado neutrófilos y es indicativo de que el individuo se puede clasificar como de alto riesgo como se describe en el presente documento.

Los inventores han demostrado que la actividad transmisible del factor humoral en plasma se puede eliminar mediante la eliminación de endotoxina. De forma análoga, la activación de neutrófilos se puede estimular mediante la exposición de esos neutrófilos a endotoxina.

Los ensayos con respecto al factor transmisible se pueden adaptar por lo tanto para la detección de endotoxina o sus efectos. Por ejemplo, los ensayos pueden detectar la presencia de endotoxina en el plasma del individuo, o efectos específicos de esa endotoxina. La presencia o actividad de endotoxina se puede detectar usando métodos conocidos en la técnica.

La medida de la actividad de endotoxina se puede conseguir en una variedad de maneras. Por ejemplo, un método de la invención comprende la evaluación de la función de los neutrófilos del individuo mediante la evaluación de la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos. Otras funciones de neutrófilos incluyen su capacidad para realizar otras funciones de neutrófilos esenciales tales como estallido oxidativo o desgranulación. Algunos efectos bioquímicos específicos de la activación de neutrófilos también se pueden evaluar, como la liberación de oxidantes reactivos o producción de ácido hipocloroso después de la activación de MPO por una población de neutrófilos.

La presencia de, o cantidad de, endotoxina se puede evaluar en una variedad de maneras. Esto implicará la detección de, y/o medida de, endotoxina, una actividad de endotoxina, o un efecto de la endotoxina corriente abajo, y una comparación con la presencia, cantidad, o nivel de endotoxina, actividad de endotoxina o un efecto de la endotoxina corriente abajo en un individuo normal. Por ejemplo, esto puede implicar la detección de, y/o medida de una función de los neutrófilos en el individuo y una comparación con el mismo o equivalente función en neutrófilos normales. Por ejemplo, la presencia, cantidad o efecto de endotoxina, como función de los neutrófilos, en una muestra de un individuo con insuficiencia hepática se puede comparar con la presencia, cantidad o efecto de endotoxina, tal como función de los neutrófilos, en una muestra de control, tal como una muestra (por ejemplo, de neutrófilos) que no es de ese individuo. La muestra de control para comparación puede ser de un individuo que no tiene enfermedad hepática o un individuo que no tiene insuficiencia hepática, tal como un individuo que tiene una función hepática normal. Tal comparación con una muestra normal, tal como neutrófilos con funcionamiento normal permitirá una evaluación de si los niveles de endotoxina (por ejemplo, función de los neutrófilos) en el individuo con insuficiencia hepática son normales, y por lo tanto el individuo presenta un riesgo bajo de los factores que se describen en el presente documento, o si los niveles de endotoxina (por ejemplo, función de los neutrófilos) son anómalos, y por lo tanto el individuo presenta un riesgo elevado para la factores que se describen en el presente documento.

En algunos ensayos, se puede evaluar la proporción de neutrófilos en una muestra que reacciona de una manera en particular. En otros ensayos, la reacción global de una población se puede cuantificar. En otros ensayos, se puede evaluar la reacción promedio de los individuos dentro de una población de neutrófilos. Todavía en otros ensayos, la presencia o ausencia de factores específicos en una muestra se puede evaluar o cuantificar.

Cuando el ensayo implica la cuantificación de una medida de presencia, actividad o efecto de endotoxina, tal como función de los neutrófilos, una comparación de la cantidad obtenida en relación con un individuo que tiene enfermedad hepática se puede comparar con la cantidad obtenida para un control. Cuando las cantidades son las mismas o similares, la endotoxina en el individuo se puede considerar normal y el individuo se puede clasificar como de bajo riesgo. Una cantidad que es similar a un control puede diferir de la de control en menos de un 1 %, menos de un 2 %, menos de un 5 %, menos de un 10 % o menos de un 20 %. Cuando las cantidades son diferentes, la endotoxina en el individuo se puede considerar anómalo y el individuo se puede clasificar como de alto riesgo. Una cantidad que es diferente a la de un control puede diferir de la del control en más de un 1 %, más de un 2 %, más de un 5 %, más de un 10 % o más de un 20 %. Un umbral adecuado para evaluar si existe una diferencia se puede determinar basándose en el ensayo que se está usando en particular. Por ejemplo, cuando un ensayo tiene un alto

grado de variabilidad entre muestras de control, una mayor varianza del control se puede considerar una diferencia de acuerdo con la invención. Cuando un ensayo tiene menos variabilidad y las muestras de control muestran una mayor coherencia, una diferencia más pequeña desde el control se puede considerar tal diferencia.

- 5 Como se explica a continuación con más detalle, puede que no sea necesario realizar una comparación directa de muestras de insuficiencia hepática (por ejemplo, neutrófilos) y muestras normales (por ejemplo, neutrófilos) en cada ocasión. Para algunos ensayos, será posible establecer un nivel de umbral o punto de corte basándose en los resultados obtenidos a partir de un número de individuos. Los resultados obtenidos de un individuo se pueden comparar a continuación con ese nivel de umbral o punto de corte, en lugar de con otra muestra, para determinar si la endotoxina (por ejemplo, función de los neutrófilos) es normal o anómala, y si el individuo se clasifica como en alto riesgo o bajo riesgo.

15 La función de los neutrófilos se puede evaluar con el nivel de activación de los neutrófilos. Un aumento del nivel de activación de neutrófilos en comparación con los neutrófilos de un control normal es indicativo de que el individuo está en riesgo elevado de los factores que se describen en el presente documento. Como se muestra en los Ejemplos, los inventores han encontrado que en algunos individuos (clasificados como de bajo riesgo), los neutrófilos generalmente están cebados, pero no activados, mientras que en otros individuos (clasificados como de alto riesgo), los neutrófilos están generalmente activados. Los neutrófilos cebados están listos para responder a un ataque bacteriano. El cebado de los neutrófilos implica cambios funcionales y estructurales que dan como resultado un aumento de la respuesta a una estimulación microbiana y se describe bien en la técnica. Los neutrófilos activados también se describen bien en la técnica.

25 Una función de los neutrófilos que se evalúa de acuerdo con la invención es la fagocitosis de neutrófilos. Los inventores han observado que la fagocitosis de neutrófilos es anómala en individuos clasificados como de alto riesgo para los factores que se describen en el presente documento. Por lo tanto, un individuo que presenta una fagocitosis anómala en comparación con la fagocitosis por una población normal de neutrófilos se puede clasificar como de alto riesgo para los factores que se describen en el presente documento. Un nivel y grado de fagocitosis de neutrófilos similares es indicativo de que el individuo se debería clasificar como de bajo riesgo para los factores que se describen en el presente documento. Los inventores observaron que en individuos de alto riesgo, los neutrófilos eran capaces de fagocitar bacterias de una manera similar a la de los controles sanos, pero el número de bacterias fagocitadas por cada neutrófilo se reducía de forma significativa en comparación con el control normal de neutrófilos. Por lo tanto, los individuos se pueden clasificar como de alto riesgo si sus neutrófilos muestran tal alteración en la capacidad de fagocitosis. Esto se puede indicar mediante una disminución global de la fagocitosis por una población de neutrófilos, o mediante una disminución en el nivel de la fagocitosis conseguida neutrófilos individuales.

35 Un número de enfoques diferentes se puede usar para cuantificar o valorar la fagocitosis. Por ejemplo, algunos métodos evaluarán el número total o proporción de neutrófilos que muestran fagocitosis dentro de una muestra. Esto puede proporcionar una indicación de la actividad fagocítica relativa de diferentes muestras, ya que tales muestras pueden comprender poblaciones de neutrófilos que presentan fagocitosis de forma activa, y poblaciones de neutrófilos que no lo hacen. Como alternativa, algunos métodos pueden evaluar la cantidad total de fagocitosis que se está produciendo en una muestra, tal como el número de bacterias que se fagocitan cuando entran en contacto con una población dada de neutrófilos. Tales métodos pueden proporcionar una indicación de la tasa de destrucción de bacterias por una población de neutrófilos dada. Una tasa de destrucción por célula de neutrófilo también se puede determinar en una base de muestra a muestra.

45 Esto se puede evaluar directamente, mediante la cuantificación del nivel de fagocitosis conseguido por tales células. Esto se puede conseguir mediante etiquetado de material, tal como células, que se van a fagocitar, lo que permite que se produzca fagocitosis y a continuación cuantificar y/o localizar la etiqueta para indicar si y cuántas células han fagocitado los neutrófilos. Por ejemplo, el kit Phagotest® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) usa bacterias de *E. coli* opsonizadas etiquetadas con FITC y se puede usar para medir el porcentaje global de neutrófilos que muestran fagocitosis y el número de bacterias atrapadas por célula. Por lo tanto, un método de la invención puede cuantificar el número de neutrófilos en una muestra que presenta fagocitosis. Un método de la invención puede cuantificar el nivel de actividad de fagocitosis mostrada por neutrófilos individuales. Esto se puede conseguir mediante la cuantificación del número de células que los neutrófilos individuales, o una población de neutrófilos son capaces de fagocitar.

60 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la función de los neutrófilos se evalúa en un individuo. Preferentemente con esto se realiza *in vitro* o *ex vivo* en una muestra del individuo. Como se explica en el presente documento, la función anómala de los neutrófilos se puede usar como un indicador de la progresión de la enfermedad en un paciente con insuficiencia hepática. Como se ha explicado anteriormente, la función anómala de los neutrófilos se puede detectar mediante la reducción de la actividad fagocítica. Los pacientes en los que se observa reducción de fagocitosis, se pueden clasificar como de alto riesgo de los factores que se describen en el presente documento.

65 Los indicadores de la función anómala de los neutrófilos se pueden cuantificar mediante comparación con los niveles relativos en individuos que no padecen enfermedad hepática. Por ejemplo, una muestra de neutrófilos de un

individuo que no está afectado por una enfermedad hepática o un individuo que no tiene insuficiencia hepática se puede usar para comparación. Por lo general, los neutrófilos de control para comparación deberían ser de una fuente en la que se espera que los neutrófilos sean normales. Un número de tales muestras se puede usar para conseguir un nivel medio "normal" para la función que se está evaluando. Usando un enfoque de este tipo, puede ser posible establecer niveles particulares de, por ejemplo, fagocitosis u otra función de los neutrófilos que serán particularmente indicativos de estos efectos clínicos.

De acuerdo con la presente invención, una determinación de la función de los neutrófilos mediante una evaluación de la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos, se pueden usar para clasificar individuos. Usando estos métodos, los individuos que tienen insuficiencia hepática se pueden clasificar como de alto riesgo o de bajo riesgo de una diversidad de factores. Como se ha descrito anteriormente, los individuos se pueden clasificar de esta manera basándose en la función de sus neutrófilos.

Los individuos en los que los neutrófilos funcionan por lo general de la misma manera que los neutrófilos normales (por ejemplo, de un individuo que no tiene enfermedad hepática) se clasifican como de bajo riesgo. Estos individuos tienen un riesgo menor de factores tales como infección, insuficiencia orgánica y mortalidad. Estos individuos son más propensos a responder a las terapias de insuficiencia hepática convencionales, tales como agentes inmunosupresores, corticosteroides y antibióticos.

Los individuos en los que los neutrófilos no están funcionando normalmente se clasifican como de alto riesgo. Como se describe en el presente documento, la función anómala de los neutrófilos se puede observar como, por ejemplo, disminución de fagocitosis. Los individuos en esta categoría se encuentran en mayor riesgo de infección, mayor riesgo de insuficiencia orgánica y mayor riesgo de mortalidad. El aumento del riesgo de insuficiencia orgánica y mortalidad en estos individuos puede ser un resultado directo del aumento del riesgo de infección. Tales individuos de alto riesgo también son más propensos a no responder a tratamientos convencionales para la enfermedad hepática, tales como agentes inmunosupresores, esteroides y antibióticos. Se observa que en los estudios realizados por los inventores, este grupo de pacientes de alto riesgo tenía infección con múltiples organismos no convencionales resistentes a pesar de la terapia con antibióticos, a menudo durante el mismo ingreso hospitalario. El uso de tales tratamientos en individuos de alto riesgo puede aumentar aún más el riesgo de infección en esos individuos, y las posibles consecuencias de tal infección, tales como insuficiencia orgánica y mortalidad.

Por consiguiente, una función anómala de los neutrófilos en un individuo con insuficiencia hepática es indicativo de una mayor probabilidad de infección y/o insuficiencia orgánica, aumento de la mortalidad y disminución de la probabilidad de que el paciente responda bien a tratamiento con esteroides, antibióticos o inmunosupresores.

Los resultados informados en el presente documento también pueden tener implicaciones importantes en la selección de pacientes que tienen insuficiencia hepática para terapia inmunosupresora. Aunque existe controversia en torno al uso de corticosteroides y estrategias anti-TNF para el tratamiento de rutina de enfermedades hepáticas tales como hepatitis alcohólica, existen ciertas dudas sobre su eficacia en pacientes seleccionados. Los métodos que se describen en el presente documento pueden permitir la selección de pacientes en los que se debería considerar tal tratamiento, y en pacientes en los que se debería evitar tal tratamiento. Esto también permite la identificación de pacientes en los que se incrementa el riesgo de infección. A continuación, tales individuos se pueden vigilar con más cuidado y someter a controles y procedimientos más rigurosos con el fin de evitar que se produzca una infección de este tipo.

De forma ideal, el resultado de un método de la invención debería ser predictivo de un resultado específico, tal como mortalidad, es decir, de forma ideal, al experto en la materia le gustaría ser capaz de determinar el resultado clínico, por ejemplo supervivencia o muerte, sobre la base de tal método.

Una curva de funcionamiento del receptor (ROC) característica puede permitir que esto se consiga. Tales curvas exploran la relación entre la sensibilidad y la especificidad de un ensayo clínico para una diversidad de diferentes puntos de corte, permitiendo de este modo la determinación de un punto de corte óptimo, es decir, será deseable seleccionar un punto de corte por encima del cual el resultado perjudicial de insuficiencia hepática, tal como aumento del riesgo de infección, aumento de mortalidad y disminución de la respuesta a la inmunoterapia se indique a continuación y por debajo del cual se indique un pronóstico más positivo.

Algunas medidas usadas normalmente en la realización de un ensayo clínico son la sensibilidad y la especificidad. La sensibilidad es la probabilidad de que la enfermedad (o resultado en el caso de la presente invención) se diagnostique cuando está realmente presente y la especificidad es la probabilidad de que la enfermedad se identifique como ausente cuando está correctamente ausente. De forma ideal, tanto la sensibilidad como la especificidad deberían ser uno. Sin embargo, el cambio del punto de corte para tratar de aumentar una de sensibilidad y especificidad normalmente dará lugar a una disminución en la otra.

La curva de ROC es una técnica gráfica para establecer el punto de corte óptimo. Para construir una curva de ROC se necesita calcular la sensibilidad y la especificidad para cada valor de punto de corte posible. Para hacer el gráfico ROC, el eje X es 1 menos la especificidad y el eje Y es la sensibilidad. Una línea diagonal se extrae de la esquina

inferior izquierda a la esquina superior derecha. Este gráfico refleja las características de un ensayo sin capacidad de discriminación. Cuanto más se acerca el gráfico a la esquina superior izquierda, mejor es para discriminar entre casos y no casos. Un índice de calidad del ensayo es el área bajo la curva - cuanto más cerca de uno esté este valor, mejor es la capacidad de discriminación del ensayo.

5 Por consiguiente, una curva de ROC se puede usar para establecer un punto de corte para un ensayo de la invención. Una puntuación por encima del punto de corte puede ser indicativa de resultados perjudiciales, mientras que una puntuación por debajo del punto de corte puede ser indicativa de resultados no perjudiciales.

10 El punto de corte se puede seleccionar dependiendo de los requisitos del ensayo, por ejemplo si es más importante excluir falsos positivos o si es más importante identificar todos los positivos verdaderos. En el caso de un ensayo para identificar a los pacientes ingresados con insuficiencia hepática que van a morir, es importante que todos esos pacientes se identifiquen como en cuyo caso el punto de corte también puede identificar bien un número de falsos positivos.

15 Los expertos en la materia pueden identificar un punto de corte apropiado.

Los ejemplos muestran que un punto de corte de un 42 % de GMFI en el ensayo de Phagotest® tenía una sensibilidad de un 86 % y una especificidad de un 76 % para predicción de muerte. Un paciente que tiene menos de un 42 % de la GMFI normal se puede clasificar como con aumento de riesgo de infección, aumento de mortalidad y disminución de la probabilidad de respuesta al tratamiento con inmunosupresores tal como tratamiento con esteroides. Un paciente que tiene un valor mayor o igual que un 42 % de la GMFI normal en este ensayo se puede clasificar como con un aumento del riesgo de infección, disminución de la mortalidad y aumento de la probabilidad de respuesta a tratamiento con inmunosupresores.

25 Como alternativa, el método de la invención se puede usar para dar información de pronóstico relativa o comparativa sobre un individuo. Por ejemplo, para algunas medidas de la función de los neutrófilos puede existir una relación lineal, con mayor desviación de la función normal que se correlaciona con un aumento de la gravedad de la enfermedad hepática o un pronóstico cada vez peor para el paciente.

30 El método de la invención se puede realizar en combinación con uno o más sistemas de puntuación adicionales usados para evaluar la gravedad de enfermedad hepática y encefalopatía hepática y también el pronóstico de los sujetos. Por ejemplo, de aproximadamente dos, tres, cuatro o más a aproximadamente cinco, seis, siete, ocho o más sistemas de puntuación se pueden combinar con los de la invención. Tales sistemas de puntuación adicionales incluyen el sistema de puntuación de Child-Pugh, Criterios de West Haven, Escala de Coma de Glasgow o sistema de puntuación de Child-Pugh modificado. Como alternativa, o además, se pueden usar DF, SOFA, MELD o sistema de puntuación APACHE II como sistemas de puntuación usados. Los puntos se asignan a parámetros que incluyan niveles de bilirrubina en suero, niveles de albúmina en suero y a signos que incluyen presencia de ascitis o encefalopatía. Los sujetos a tratar se pueden clasificar en la clase A, B o C de Child-Pugh. Por lo general, los sujetos a tratar se clasifican en la clase C de Child-Pugh.

La evaluación de la función hepática puede ser útil en una amplia gama de situaciones. Por ejemplo, el método permite distinguir los pacientes con disfunción hepática de los que no tienen disfunción hepática. Por lo tanto, la progresión de la cirrosis alcohólica se puede controlar usando el método de la invención; en particular, se pueden identificar aquellos pacientes que son propensos a sufrir un resultado perjudicial. Es decir, el método de la invención se puede usar para predecir el resultado de cirrosis alcohólica.

Por lo tanto, la invención permite la selección de un tratamiento adecuado para un individuo con cirrosis alcohólica. Será menos probable que un paciente que presenta disminución de fagocitosis de neutrófilos, como se describe en el presente documento, responda bien a tratamientos convencionales de enfermedad hepática, tales como tratamiento con esteroides, administración de antibióticos y terapias con inmunosupresores. De hecho, es probable que si se administran terapias con inmunosupresores a tal paciente, el pronóstico de ese paciente podría empeorar, con un aumento del riesgo de infección y mortalidad. Por lo tanto, la presente invención permite la selección de un enfoque adecuado para el tratamiento de cirrosis alcohólica en un individuo, dependiendo de si ese individuo también presenta una función anómala de neutrófilos. Si el paciente no presenta una función anómala de neutrófilos, entonces se podría esperar que algunas inmunoterapias, administración de antibióticos o tratamiento con esteroides fuera beneficios.

La insuficiencia hepática es la etapa final de la enfermedad hepática. La insuficiencia hepática se divide en tipos en función de la rapidez del inicio. La insuficiencia hepática aguda se desarrolla rápidamente, pero la insuficiencia hepática crónica puede tardar meses o años en desarrollarse. Por definición, la insuficiencia hepática se produce cuando el hígado está demasiado enfermo, y funciona con deficiencia, que la encefalopatía es evidente. Cualquier enfermedad hepática progresiva puede dar como resultado insuficiencia hepática; algunos ejemplos incluyen: toxicidad con acetaminofeno, cirrosis, hepatitis vírica y cáncer metastásico del hígado. Otros signos de enfermedad hepática tales como ictericia, ascitis, hedor hepático y fallo de coagulación indican que el hígado está teniendo problemas para realizar sus funciones fisiológicas normales, pero no se denomina insuficiencia hepática hasta que

aparecen cambios en el estado mental.

El pronóstico para pacientes con enfermedad hepática o insuficiencia hepática es difícil de calcular debido a que la afección tiene muchas causas. Sin embargo, de acuerdo con la invención, es posible predecir el resultado clínico de la enfermedad hepática, en particular en pacientes con insuficiencia hepática aguda, así como en aquellos con ACLF. Es particularmente útil en la predicción de la evolución clínica en pacientes con hepatitis alcohólica.

Por consiguiente, el método de la invención realiza en un individuo que padece cirrosis alcohólica. Este puede ser un individuo cuyo hígado está descompensado o que muestra encefalopatía hepática. El hígado del individuo puede estar en el estado compensado. El método se realiza preferentemente en un individuo que se encuentra en insuficiencia hepática. El individuo puede tener una enfermedad hepática crónica. El individuo tiene cirrosis hepática, por ejemplo, con o sin hepatitis alcohólica. El individuo puede tener insuficiencia hepática aguda. El individuo puede tener encefalopatía hepática.

La enfermedad hepática crónica puede ser inducida por alcohol. Un hombre o una mujer a tratar pueden ser, o haber sido, un alcohólico. Él o ella pueden ser, o haber sido, consumidores de un promedio de 50 o más unidades de alcohol a la semana, de 60 o más unidades de alcohol a la semana, 75 o más unidades de alcohol a la semana e incluso 100 o más unidades de alcohol a la semana. El hombre o la mujer pueden ser, o haber sido, consumidores de un promedio de hasta 100 unidades de alcohol a la semana, hasta 150 unidades de alcohol a la semana e incluso hasta 200 unidades de alcohol a la semana. La medida de una unidad de alcohol difiere de un país a otro. Aquí, una unidad equivale a 8 gramos de etanol de acuerdo con el patrón del Reino Unido.

El hombre o la mujer puede haber estado consumiendo tales niveles de alcohol durante 5 o más años, 10 o más años, 15 o más años o 20 o más años. El individuo puede haber estado consumiendo dichos niveles de alcohol hasta 10 años, hasta 20 años, hasta 30 años e incluso hasta 40 años. En los casos de cirrosis hepática inducida por alcohol, el individuo puede aparecer envejecido, por ejemplo, 25 años o más, 35 años o más, 45 años o más e incluso más de 60 años.

El individuo puede ser hombre o mujer. Las mujeres pueden ser más susceptibles a los efectos adversos del alcohol que los hombres. Las mujeres pueden desarrollar enfermedad hepática crónica alcohólica en un periodo de tiempo más corto y por cantidades más pequeñas de alcohol que los hombres. No parece que exista ningún factor que tenga en cuenta el aumento de la susceptibilidad al daño hepático alcohólico en las mujeres, pero el efecto de las hormonas en el metabolismo del alcohol puede desempeñar un papel importante.

Por lo tanto, el individuo puede estar padeciendo hepatitis alcohólica. La hepatitis alcohólica puede variar desde una hepatitis leve, con ensayos de laboratorio anómalos siendo la única indicación de enfermedad, a disfunción hepática grave con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por retención de bilirrubina), encefalopatía hepática, ascitis, varices esofágicas sangrantes, coagulación sanguínea anómala y coma.

El individuo puede tener una o más de una serie de otras afecciones conocidas de las que se sabe que dan como resultado daño hepático tales como, por ejemplo, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune crónica activa, y/o esquistosomiasis (infección parasitaria). El individuo puede tener o haber tenido una obstrucción de los conductos biliares. En algunos casos, la causa subyacente de la enfermedad hepática puede no conocerse. Por ejemplo, el individuo puede haber sido diagnosticado con cirrosis criptogénica. Por consiguiente, se puede sospechar que el individuo tiene cualquiera de las afecciones enumeradas en el presente documento.

Algunos métodos para el pronóstico de enfermedad hepática tales como insuficiencia hepática aguda y encefalopatía hepática se conocen bien en la técnica y en particular por médicos y veterinarios en el campo. Preferentemente con el individuo habrá sido diagnosticado con insuficiencia hepática, por ejemplo por un profesional médico o veterinario. El individuo puede mostrar uno o más síntomas asociados con enfermedad hepática tales como uno o más de ictericia, ascitis, cambios en la piel, retención de líquidos, cambios en las uñas, fácil aparición de hematomas, hemorragias nasales, varices esofágicas, y en individuos de sexo masculino puede haber aumento de los pechos. El individuo puede mostrar cansancio, fatiga, pérdida de apetito, náuseas, debilidad y/o pérdida de peso. El individuo también puede mostrar uno o más síntomas asociados con la encefalopatía hepática, tales como uno o más de confusión, desorientación, demencia, estupor, coma, edema cerebral, insuficiencia de múltiples órganos (insuficiencia respiratoria, insuficiencia cardiovascular o insuficiencia renal), inflexibilidad/rigidez muscular, convulsiones o deterioro del lenguaje. El individuo a tratar puede o no estar tomando otros fármacos para tratar la enfermedad hepática. El individuo a tratar puede presentar riesgo de desarrollo de encefalopatía hepática.

La enfermedad hepática puede haber sido, o ser, confirmada por el examen físico que incluye técnicas tales como ecografía. Se pueden haber tomado biopsias de hígado para buscar acumulación de fibrosis, células necróticas, degeneración celular y/o inflamación y otros rasgos característicos de la enfermedad hepática. La función hepática se puede haber evaluado en el individuo para determinar si ésta se ve comprometida en el individuo. La naturaleza y la causa subyacente de la enfermedad hepática se pueden caracterizar. Se puede determinar cualquier historia de exposición a agentes causantes de enfermedad hepática.

El individuo a tratar pueden presentar riesgo de episodios de encefalopatía hepática, por ejemplo pacientes que esperan trasplantes de hígado, pacientes con hipertensión quirúrgica y/o portal. Una persona en riesgo de episodios de encefalopatía hepática es una persona que no ha padecido ningún episodio de encefalopatía hepática o no ha padecido ningún episodio de encefalopatía hepática durante un periodo prolongado de tiempo (aproximadamente 12 semanas o superior), pero tiene un trastorno o afección médica que crea un riesgo de episodios de encefalopatía hepática. Un episodio de encefalopatía hepática es una afección clínica caracterizada por la presencia de disfunción cerebral en pacientes con enfermedad o disfunción hepática. Hay un amplio espectro de trastornos mentales en la encefalopatía hepática que varían desde un mínimo en el que los principales efectos son una reducción de la calidad de vida, hasta conocimiento público que conducen a, y por último a la muerte.

En la invención, se evalúa la función de los neutrófilos de un individuo. Por lo general, el método se realiza *in vitro* o *ex vivo* en una muestra del individuo. Por lo general, la muestra será de un tejido de que se sabe que contiene neutrófilos o un tejido que ha estado en contacto con neutrófilos.

Por lo general, la muestra comprende un fluido corporal del individuo. La muestra puede ser una muestra de sangre del individuo, tal como una muestra de sangre, que comprende neutrófilos. La muestra puede ser una muestra de sangre que se ha procesado para eliminar otros componentes pero dejando algunos componentes, por ejemplo neutrófilos, presentes. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre que se ha fraccionado y una fracción que comprende los neutrófilos seleccionados. La función de los neutrófilos se puede evaluar en una población de neutrófilos o en los neutrófilos individuales. Por ejemplo, algunos ensayos medirán la proporción de neutrófilos en una muestra que tienen una característica o respuesta en particular. Otros ensayos evaluarán las características o la función de los neutrófilos individuales. La muestra puede ser un componente de la sangre con la que el neutrófilo ha estado en contacto. La muestra puede contener neutrófilos. La muestra puede no contener neutrófilos. La muestra puede no contener células. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de plasma de un individuo. Estas muestras se pueden obtener de cualquier manera apropiada. Los expertos en la materia conocen bien algunos métodos para obtener la sangre, plasma y otras fracciones de sangre.

La información obtenida mediante la evaluación de endotoxinas (por ejemplo, función de los neutrófilos) se puede usar para seleccionar un agente terapéutico adecuado. Por ejemplo, si la evaluación de la endotoxina conduce a una clasificación del individuo como de alto riesgo, como se describe en el presente documento, se pueden evitar los tratamientos tales como inmunosupresores, esteroides y antibióticos. Si la evaluación de la endotoxina conduce a una clasificación del individuo como riesgo bajo, como se describe en el presente documento, se pueden seleccionar tratamientos tales como inmunosupresores, esteroides y antibióticos para el tratamiento de ese individuo.

Por lo tanto, la invención también se puede usar en combinación con un método para tratamiento de insuficiencia hepática, método que comprende la determinación de si o no el individuo tiene endotoxinas anómalas usando un método como se ha descrito anteriormente y

- (a) si el individuo tiene endotoxinas anómalas (por ejemplo, función de los neutrófilos anómala), administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente útil en el tratamiento de insuficiencia hepática que no tiene un efecto inmunosupresor; o
- (b) si el individuo no tiene endotoxinas anómalas (por ejemplo, función de los neutrófilos), administrara al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente útil en el tratamiento de insuficiencia hepática que tiene un efecto inmunosupresor.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

MÉTODOS

Selección del paciente

Todos los pacientes o sus familiares firmaron el consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el comité de ética local. Los pacientes ingresados con evidencia de cirrosis alcohólica se seleccionaron para este estudio, en el momento de una biopsia hepática transyugular indicada de forma clínica. Los pacientes se incluían si eran admitidos con descompensación aguda de cirrosis alcohólica manifestada con el aumento de ictericia, ascitis o grado 1 o 2 de encefalopatía hepática y así era si no había evidencias microbiológicas (cultivos de rutina de orina, sangre, esputo y ascitis) de la infección. Los pacientes se excluían si tenían < 18 o > 75 años de edad, había evidencia de: insuficiencia orgánica (necesidad de inotrópicos, insuficiencia renal - creatinina > 150, grado 3 o 4 de encefalopatía hepática, necesidad de ventilación mecánica, disfunción cardíaca grave), hiponatremia, neoplasia hepática/extrahepática, con 3 días de sangrado gastrointestinal o si recibían alguna terapia con inmunomoduladores antes de la entrada en el estudio.

Diseño del estudio

Después de la corrección de cualquier trastorno electrolítico asociado o hipovolemia, se recogieron muestras de sangre y se usaron para detección de bioquímica de rutina, función de los neutrófilos, perfil de citoquinas y ácido tiobarbitúrico (T-BARS/MDA modificado). La sangre venosa periférica se recogió de forma aséptica en tubos sin pirógenos (BD Vacutainer con Heparina-Litio, 60 U por tubo, Beckton y Dickinson, Plymouth, Reino Unido) de pacientes y voluntarios sanos. Para experimentos con células, la sangre se mantuvo a temperatura ambiente, para recogida de plasma, la sangre se colocó en hielo inmediatamente. Después de centrifugación, el plasma se dividió en alícuotas en condiciones sin pirógenos en criotubos sin endotoxinas (Corning Inc., Corning, NY) y se almacenó a -80 °C hasta su análisis posterior. Se usaron 100 µl de sangre completa o 50 µl de neutrófilos aislados y 50 µl de plasma para realizar el Phagoburst® o el Phagotest®. Para todos los experimentos se tomaron precauciones estrictas para evitar la contaminación con endotoxinas mediante trabajando de forma aséptica y usando equipo sin endotoxinas. Se evaluaron bilirrubina, albúmina, ensayos de función hepática, parámetros de coagulación, hemograma completo, y la proteína C reactiva (CRP) de forma rutinaria. Se calculó la función de Maddrey y la puntuación de Pugh. Los pacientes se siguieron de forma prospectiva durante un período de 90 días. La aparición de disfunción orgánica y mortalidad se registraron. La identificación sistemática de cultivos de sangre se realizó con regularidad, y la política de unidad de los inventores era usar antibióticos profilácticos en el momento de la presentación en la mayoría de los pacientes.

Neutrófilos

Los neutrófilos se investigaron en cualquiera de un ensayo de sangre completa (como se describe a continuación) o después de aislamiento con una centrifugación de gradiente de una etapa.

Activación de neutrófilos (estallido oxidativo) y Fagocitosis

El kit Phagoburst® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) se usó para determinar el porcentaje de neutrófilos se producen oxidantes reactivos mediante estimulación con bacterias de *E. coli* opsonizadas o sin ningún estímulo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El Phagotest® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) se usó para medir el porcentaje total de neutrófilos que presentaban fagocitosis y la actividad fagocítica celular individual usando bacterias de *E. coli* opsonizadas etiquetadas con FITC (dejase el apéndice). Los neutrófilos se seleccionaron de acuerdo con características de dispersión directa y lateral (figura 2A) y posteriormente se analizó el porcentaje de células positivas para CD 16 - células positivas para FITC, que correspondía al porcentaje de neutrófilos experimentando fagocitosis y la media geométrica de intensidad de fluorescencia (GMFI), que corresponde al número de bacterias atrapadas por una célula (figura 1B, D, F). Para evitar la variabilidad debida a diferencias de lote a lote de bacterias, los resultados se normalizaron con respecto a la media de al menos 3 muestras de control sanas para cada nuevo lote de bacterias usadas. Las muestras se analizaron por triplicado o duplicado.

Incubación con endotoxina

La endotoxina (Lote 085K4068 de 0111:B4 de *E. coli*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) se preparó como una solución de reserva de 1 mg/ml y se diluyó en el momento con PBS con respecto a las concentraciones indicadas. La sangre completa se incubó durante 1 h con la respectiva concentración de endotoxina a 37 °C en un baño de agua antes de realizar Phagotest® o Bursttest®.

Eliminación de endotoxinas de columnas del paciente

Uso de Detoxigel

Se usaron columnas rellenas previamente con Detoxi-Gel® Affinity-pack (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) que contenía un gel de eliminación de endotoxinas que consiste en polimixina B inmovilizada que se une a la parte del lípido A de lipopolisacáridos bacterianos para eliminar endotoxinas de muestras de plasma. Se incubaron 100 µl de esta muestra de plasma diluida, sin endotoxinas con 50 µl de suspensión celular y se realizó Bursttest® o Phagotest® tal como se ha indicado.

Uso de Anticuerpo CD14:

Se incubaron 100 µl de plasma y 50 µl de PBS con 5 µl de un anticuerpo CD14 anti-humano (Clon 11D18, Immuntools, Friesoythe, Alemania) (conocido por neutralizar a LPS) durante 60 minutos antes de realizar el Phagotest® o el Bursttest®.

Citoquinas

Se determinaron TNFα, sTNFαR1, sTNFαR2, IL-6 e IL-8 en plasma usando kits disponibles en el mercado (Bio-Source International, Nivelles, Bélgica).

Malondialdehído y prostaglandina F2 α

El malondialdehído (MDA) se determinó usando un ensayo modificado de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico como se conoce en la técnica. El 8-Isoprostano F2 α libre se sometió a ensayo con un kit de EIA comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Estadísticas

Para comparación de los grupos se usaron ensayo de Chi-Cuadrado, ensayo de t o ensayo de Mann-Whitney si fuera apropiado, para comparación de más de dos grupos se usó ensayo de ANOVA con análisis a posteriori de Turkey (varianzas iguales) o Dunnett C (varianzas distintas) para conjuntos de datos si fuera apropiado. Para evaluar la precisión del pronóstico, se construyeron curvas de características de funcionamiento del receptor (ROC) y se calcularon las áreas bajo la curva (AUROC). Las diferencias de supervivencia se analizaron con el ensayo de rango logarítmico. El coeficiente de correlación de Pearson se usó para evaluar la relación entre variables. Los resultados se proporcionan como media $\pm$ ETM. Un valor de $p < 0,05$ se consideraba significativo.

Actividad de mieloperoxidasa

Se seleccionó un grupo de 10 pacientes con gravedad variable de enfermedad hepática. El estallido en reposo de neutrófilos (%) se midió en una muestra de cada paciente como se describe en el presente documento. La actividad de mieloperoxidasa (MPO) libre (sin células) también se evaluó.

La sangre se recogió en tubos revestidos con EDTA (como un anticoagulante) enfriados previamente y se almacenaron en hielo. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para separar los componentes celulares, y el plasma resultante se recogió y se almacenó en crioviales estériles a -80 °C hasta el análisis.

El análisis comprendía la incubación de plasma (50 μ l) en una solución de tampón de fosfato 100 mM (pH 7), que contenía guayacol 13 mM (2-metoxifenol) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 0,02 % a 37 °C (volumen total de 1 ml). Después de un período de equilibrio de 5 minutos, la reacción comenzó con la adición de 1 μ mol de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La evolución de la reacción se controló a 470 nm durante 60 minutos en un espectrofotómetro de matriz de diodo. La actividad de MPO se determinó a partir de la tasa de cambio en la absorbancia a 470 nm (después de eliminar las señales de absorbancia de fondo), y se expresa en unidades de guayacol (definidas como la cantidad de enzima que forma 1 μ mol de tetraguayacol por minuto, usando un coeficiente de extinción de 26 mM⁻¹cm⁻¹).

Este método se adapta a partir de: Cramer *et al.*, J Immunol Methods. 11 de mayo de 1984; 70 (1): 119-25.

RESULTADOS**Características del paciente**

De los 72 pacientes identificados sistemáticamente, se incluyeron 63 pacientes. Los pacientes se clasificaron histológicamente en los que tenían inflamación significativa, usando un sistema de puntuación de NASH modificado (cirrosis + AH) en comparación con solamente con cirrosis. Los pacientes con cirrosis + AH (n = 23) estaban más gravemente enfermos tal como se pone en evidencia con una puntuación de MELD y Pugh más elevada ($p < 0,001$) en comparación con pacientes solamente con cirrosis (n = 40). Los pacientes con cirrosis + AH también tenían CRP ($p < 0,005$), glóbulos blancos ($p < 0,001$), bilirrubina ($p < 0,001$) y tiempo de protrombina ($p < 0,001$) significativamente más elevados. Los pacientes tenían niveles más elevados de TNF α , IL6, IL8, sTNF α R1, sTNF α R2, MDA y prostaglandina F2 α que los controles. Los pacientes con cirrosis + AH tenían niveles significativamente más elevados de IL6, IL8 y sTNF α R2, pero no se observaban cambios estadísticamente significativos para TNF α , sTNF α R1 y estrés oxidativo. No se encontró correlación con la gravedad de la enfermedad. Para los experimentos *ex vivo*, se usó sangre o plasma de 16 de estos 63 pacientes. Los datos clínicos de la medida inicial para estos 63 pacientes no era significativamente diferente de la de la población base completa. La Tabla 1 muestran las características de la medida inicial para todos los pacientes y para los subgrupos que tienen estallido en reposo elevado y bajo (véase a continuación).

Estallido oxidativo y fagocitosis en pacientes con cirrosis alcohólica

En neutrófilos de paciente sin estimular, el estallido oxidativo de neutrófilos aumentaba cuando se comparaba con los controles. Los neutrófilos de pacientes con cirrosis alcohólica general tenían un estallido oxidativo en reposo 5,6 veces más elevado ($p < 0,001$) que los controles sanos. Los neutrófilos de pacientes con cirrosis + AH tenían estallido oxidativo en reposo significativamente más elevado en comparación con pacientes solamente con cirrosis ($p < 0,001$) o controles ($p < 0,001$, figura 2A). La estimulación con fMLP, que indica cebado, causaba una reacción de estallido oxidativo significativamente más elevada en pacientes con cirrosis ($p = 0,01$) y cirrosis + AH ($p = 0,001$) en comparación con los controles mientras que no había diferencia en la respuesta a PMA entre los grupos. La

diferencia entre estallido en reposo y respuesta a fMLP era significativamente menor en pacientes con cirrosis + AH ($1,8 \pm 4,7$) que en pacientes con cirrosis ($22,4 \pm 6,9$, $p = 0,02$), lo que muestra que la adición de fMLP en pacientes con cirrosis + AH no es capaz de aumentar la función de las células nunca más. Además, después de la estimulación con *E. coli*, el aumento relativo del estallido oxidativo de los niveles en reposo disminuía de forma significativa en pacientes con cirrosis + AH en comparación con pacientes solamente con cirrosis ($p = 0,001$) o controles ($p < 0,001$, figura 2B). La capacidad fagocítica se midió con la media geométrica de intensidad de fluorescencia (GMFI), que indica el número de bacterias atrapadas por una célula. Los pacientes con cirrosis + AH atrapaban significativamente menos bacterias que los controles ($p = 0,031$, figura 2C). El porcentaje de células que atrapan al menos una bacteria no difería entre los grupos.

Asociación de estallido oxidativo en reposo y fagocitosis con infección, insuficiencia orgánica y supervivencia

Diecisiete (26 %) desarrollaron insuficiencia orgánica y 13 (21 % de todos los pacientes estudiados) murieron durante el ingreso hospitalario. La insuficiencia orgánica más común encontrada era renal, observada en 15 de los pacientes con insuficiencia orgánica (88 %), con 4 pacientes desarrollando esto como parte de insuficiencia multiorgánica con necesidades de ventilación y apoyo circulatorio. A los 90 días, 14 (22 %) pacientes habían muerto, 47 estaban vivos y 2 se perdieron durante el seguimiento. Se encontró que el estallido oxidativo en reposo era predictivo de supervivencia de 90 días (AUROC 0,77, $p = 0,003$, figura 4A) e insuficiencia orgánica (AUROC 0,76, $p < 0,001$). Un punto de corte de estallido en reposo < 55 % tenía una sensibilidad de un 77 % y una especificidad de un 69 % para predicción de muerte. Los pacientes con un estallido oxidativo en reposo < 55 % sobreviven de forma significativamente mejor que los que tienen un estallido en reposo ≥ 55 % ($p < 0,005$, figura 4B). La función fagocítica también era predictiva de supervivencia (AUROC 0,80, $p = 0,02$, figura 5A) e insuficiencia orgánica (AUROC 0,91, $p < 0,0001$). Una GMFI inferior a un 42 % de la normal dentro de la población de pacientes estudiados tenía una sensibilidad de un 86 % y una especificidad de un 76 % para predecir mortalidad (figura 5B).

En 42 (66 %) pacientes, se sospechaba de infección clínica durante el transcurso del ingreso hospitalario aunque ninguno de los pacientes incluidos tenían una infección demostrada en el momento de evaluar la función de los neutrófilos. Estos datos deberían considerarse en contexto ya que el protocolo de los investigadores para la gestión necesita el uso de antibióticos de amplio espectro en cuanto se sospecha de una infección. En 26 de estos pacientes (62 %), se verificó infección positiva en cultivo. En 13, se encontró más de un organismo. Era más probable que los pacientes con un elevado en reposo estallido (> 55 %) desarrollaron infecciones positivas en cultivo (un 57 % con respecto a un 27 %, chi-cuadrado $p = 0,01$), antes durante la estancia en el hospital (8 con respecto a 23 días, $p = 0,04$) y con más de un organismo ($n = 10$; $n = 3$ en pacientes con estallido en reposo bajo). Era más probable que los pacientes con cirrosis + AH desarrollaron infecciones positivas en cultivo (un 65 % con respecto a un 28 %, $p = 0,004$). Era más probable que esos pacientes que desarrollaban infecciones positivas en cultivo desarrollaron insuficiencia orgánica ($p = 0,001$) y murieran ($p = 0,002$). Un 67 % de pacientes con una GMFI inferior a un 42 % desarrollaron infección positiva en cultivo, mientras que solamente un 21 % de pacientes con una GMFI superior a un 42 % ($p = 0,007$) también murieron. Los pacientes con GMFI baja desarrollaron infecciones antes durante su estancia en el hospital (9 con respecto a 47 días, $p = 0,03$).

Efecto de plasma de pacientes y plasma normal en estallido oxidativo de neutrófilos

El plasma de pacientes con un estallido en reposo elevado (> 55 %; $n = 6$) inducía un estallido en reposo en neutrófilos normales elevado ($p = 0,005$) mientras que el plasma de pacientes con un estallido en reposo bajo (< 55 %; $n = 6$) fallaba al hacer esto (Figura 6). El efecto de inducción de estallido era detectable inmediatamente después de mezclar el plasma en las células pero también se podría haber mostrado después de hasta una hora incubación (los resultados no se muestran). Este resultado indicaba que hay un factor transmisible presente en el plasma del paciente que provoca la activación de los neutrófilos.

Cuando los neutrófilos aislados de pacientes con estallido en reposo elevado en el ensayo de sangre completa se incubaban con plasma normal, el estallido en reposo disminuía de forma significativa en comparación con los neutrófilos aislados incubados con el plasma de los propios pacientes ($p = 0,02$; Figura 7). Estos experimentos sugerían que la eliminación de un factor presente en el plasma era capaz de reducir el estallido en reposo elevado en células de los pacientes.

Efecto de la plasma y plasma normal de pacientes sobre la fagocitosis

Los neutrófilos normales incubados con plasma de pacientes con un estallido en reposo bajo no se diferencian ante los del control, mientras que los neutrófilos normales incubados con plasma de pacientes con estallido en reposo elevado presentaban una disminución de un 22 % en la GMFI ($p = 0,03$, $n = 6$) (Figura 8). Los neutrófilos de los pacientes incubados durante 60 minutos con plasma normal presentaban un aumento de un 22 % ($p = 0,03$, $n = 6$) en la fagocitosis en comparación con neutrófilos de pacientes incubados con su propio plasma. Estos resultados indican que la alteración de la función fagocítica se puede deber a un factor en suero que es transmisible y reversible.

Efecto de endotoxinas en estallido oxidativo y fagocitosis

La sangre de cinco voluntarios sanos se incubó con concentraciones crecientes de endotoxina. Se produjo un aumento dependiente de la dosis en estallido en reposo ($p < 0,0001$, ANOVA de una vía con análisis de Turkey a posteriori; figura 9). Mediante la incubación de neutrófilos del paciente con endotoxina, la GMFI relativa se redujo en un 20 % ($n = 8$, $p = 0,02$, Figura 10). Estos resultados indican que la endotoxina activa los neutrófilos normales de una manera dependiente de la dosis imitando de este modo el efecto observado mediante incubación de plasma de los pacientes.

Efecto de eliminación de endotoxinas de plasma de pacientes*Uso de columnas de Detoxi-Gel*

El plasma de algunos pacientes del que se muestra que tiene un estallido en reposo elevado en el ensayo de sangre completa era capaz de inducir un estallido en reposo elevado en neutrófilos normales. El plasma sin endotoxinas (obtenido de pasaje a través de las columnas) no inducía un estallido en reposo elevado en neutrófilos normales ($p < 0,001$, $n = 9$). El plasma de pacientes con estallido en reposo bajo ($p = 0,91$, $n = 4$) y el plasma normal ($p = 0,25$, $n = 3$) no cambiaba el estallido en reposo. (Figura 11) La eliminación de endotoxinas del plasma de pacientes con un estallido en reposo elevado ($n = 11$) aumentaba la GMFI en un 31 % ($p = 0,03$) en comparación con las células incubadas con plasma sin tratar. El plasma de pacientes con estallido en reposo bajo ($p = 0,16$, $n = 8$) y el plasma normal ($p = 0,85$, $n = 5$) que se pasaron sobre la columna causaban cualquier cambio en GMFI (figura 12). Este conjunto de experimentos muestra que la eliminación de endotoxinas con polimixina B invierte el efecto de inducción de estallido y disminución de fagocitosis de plasma del paciente.

Uso de anticuerpos de neutralización de LPS

La incubación con un anticuerpo CD14 anti-humano de neutralización de LPS editaba la inducción de estallido elevado en células normales mediante plasma de pacientes con un estallido elevado ($p < 0,001$, $n = 7$). La incubación de plasma de pacientes con estallido bajo ($p = 0,733$, $n = 8$) o plasma normal ($p = 0,25$, $n = 3$) con el anticuerpo no cambiaba el estallido (figura 11). La incubación de plasma de pacientes con un estallido elevado con un anticuerpo CD14 anti-humano de neutralización de LPS aumenta la GMFI en un 20 % ($p = 0,04$, $n = 11$) mientras que este anticuerpo no produce ningún cambio en la GMFI cuando se usaba plasma de pacientes con estallido bajo ($p = 0,17$, $n = 8$) o plasma normal ($p = 0,78$, $n = 3$) (figura 12). Este hallazgo respalda la observación de que la endotoxina puede ser responsable de la inducción de estallido en reposo elevado en neutrófilos.

Actividad de mieloperoxidasa

Una comparación de actividad de estallido en reposo de neutrófilos (%) y mieloperoxidasa (MPO) en plasma (sin células) mostraba una relación significativa (Figura 13). Esto indica que existe una fuerte unión entre la actividad de los neutrófilos en reposo medida y la cantidad de MPO liberada en el plasma. Dado que la MPO se podría considerar perjudicial para la función metabólica normal, cuando se libera desde el entorno controlado de los neutrófilos, este hallazgo puede indicar un mecanismo de daño que se produce dentro de la enfermedad hepática. Estos datos también indican que la actividad de MPO en plasma puede proporcionar una medida útil de la gravedad de la enfermedad.

METODOLOGÍA*Activación de neutrófilos (estallido oxidativo) y Fagocitosis*

El kit Phagoburst® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) se usó para determinar el porcentaje de neutrófilos que producen oxidantes reactivos mediante estimulación con bacterias de *E. coli* opsonizadas o sin ningún estímulo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron 100 µl de sangre completa heparinizada o neutrófilos aislados (como se indica) durante 20 minutos con 20 µl de las bacterias, N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP), 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) o sin estímulo a 37 °C. La formación de los oxidantes reactivos durante el estallido oxidativo se controló mediante la adición y la oxidación de dihidrorodamina 123. Para identificar neutrófilos, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD16-PE (IOtest®, Beckman Coulter) y se analizaron con clasificación celular activada con fluorescencia, (FACS), (Becton Dickinson FACScan, San Jose, CA.) usando el software Cellquest™. Los neutrófilos se seleccionaron de acuerdo con características de dispersión directa y lateral (figura 1A) y posteriormente el porcentaje de células positivas CD 16 que produce metabolitos reactivos de oxígeno determinados con medida de fluorescencia de color verde (FL-1) (figura 1C, E, G). Las muestras se analizaron por triplicado de duplicado. El coeficiente de variación (CV) interensayos para el estallido en reposo era de un 5,4 %, un 4,2 % para estallido estimulado, el CV intraensayos para el estallido en reposo era de un 4,7 %, un 2,4 % para estallido estimulado.

Fagocitosis de Neutrófilos

El Phagotest® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) se usó para medir el porcentaje total de neutrófilos que mostraban fagocitosis y la actividad fagocítica celular individual usando bacterias de opsonizadas *E. coli* etiquetadas con FITC. Se incubaron 100 µl de sangre completa o neutrófilos aislados (como se indica a continuación) con 20 µl de bacterias a 37 °C durante 20 min mientras que una muestra de control negativo permanecía en hielo. Para identificar neutrófilos, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD-16-PE (IOTest®, Beckman Coulter). Los neutrófilos se seleccionaron de acuerdo con características de dispersión directa y lateral (figura 2A) y posteriormente se analizó el porcentaje de células positivas para CD 16 – células positivas para FITC, correspondiente al porcentaje de neutrófilos que experimentan fagocitosis y la media geométrica de intensidad de fluorescencia (GMFI), correspondiente al número de bacterias atrapadas por una célula (figura 1B, D, F). Para evitar la mala interpretación de los resultados debido a la variabilidad de lote a lote de las bacterias, los resultados se normalizan con respecto a la media de al menos 3 muestras de control sanas para cada nuevo lote de bacterias usado. Las muestras se analizaron por triplicado de duplicado. El CV interensayos para el porcentaje de fagocitosis era de un 6,8 %, para el GMFI un 10,1 % del respectivo CV intraensayos para el porcentaje de fagocitosis era de un 4,1 %, y un 1,6 % para el GMFI.

Aislamiento de Neutrófilos

Se depositaron 4 ml de sangre completa sobre 5 ml de PolymorfoPrep (Axis-Shield, Oslo, Noruega) y se centrifugó durante 30 min a 400 g, a temperatura ambiente. Los neutrófilos se cosecharon de la segunda superficie de contacto y se lavaron con PBS ((Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). El recuento de neutrófilos se hace en un Thoma-hemocitómetro y se vuelven a suspender en PBS a una densidad de 5×10^6 células en 50 µl. Para un ensayo se usaron 50 µl de suspensión celular y 50 µl de plasma. La viabilidad se sometió a ensayo mediante exclusión con Azul de Tripano y era de aproximadamente un 98 %.

Columnas de Eliminación de Endotoxinas

Para retirar endotoxinas de muestras de plasma se usaron columnas rellenas previamente con Detoxi-Gel Affinity-pack (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) que contenían un gel para eliminación de endotoxinas que consistía en polimixina B inmovilizada que se une a la parte del lípido A de lipopolisacárido bacteriano. Las columnas se regeneraron con desoxicolato sódico al 1 % (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), se lavaron con agua estéril y se equilibraron con cloruro sódico estéril al 0,9 % complementado con 50 IU/ml de heparina (Multipharm, Wexham, UK) a temperatura ambiente. Las muestras de plasma se diluyen a 1:1 con PBS y se aplican en la columna y después de descartar el vacío la muestra se recogió en un tubo de muestra sin pirógenos. Se incubaron 150 µl de esta muestra de plasma diluida, sin endotoxinas con 50 µl de suspensión celular y se realizó Bursttest® o Phagotest® como se ha indicado.

Citoquinas

TNFα, sTNFαR1, sTNFαR2, IL-6 e IL-8 se determinaron a partir de muestras de plasma anticoagulado con etilendiamina-tetraacetato usando equipos disponibles en el mercado (BioSource International, Nivelles, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite inferior para la detección de las citoquinas era 3 pg/ml. El coeficiente de variación intraensayos era de un 5,4 % a un 6,4 %. IL-6 e IL-8 eran indetectables en los controles.

TABLA 1

	todos (n = 63)	estallido en reposo bajo (n = 35)	estallido en reposo elevado (n = 28)
Muerte (%)	22	9	42
Insuficiencia orgánica (%)	26	12	43
Edad (años)	50,3 ± 1,3	52,4 ± 2,0	47,8 ± 1,6
Función hepática			
Bilirrubina (mmol/l)	151,2 ± 20,9	104,8 ± 21,8	199,8 ± 34,8 ¹
PT (seg)	15,3 ± 0,61	13,5 ± 0,5	16,8 ± 0,9 ¹
Albumina (g/l)	29,8 ± 1,1	32,7 ± 1,3	28,8 ± 1,3 ¹
DF de Maddrey (n = 23 con AH)	43,4 ± 6,8	40,0 ± 9,5	44,6 ± 8,0
Puntuación de Pugh	9,3 ± 0,4	8,3 ± 0,4	10,2 ± 0,5 ¹
MELD	15,6 ± 1,8	12,2 ± 2,0	19,1 ± 3,5
Cebado (respuesta a fMLP)	57,5 ± 5,1	47,5 ± 7,9 ²	89,1 ± 3,2 ^{1,2}

	todos (n = 63)	estallido en reposo bajo (n = 35)	estallido en reposo elevado (n = 28)
Citoquina / Inflamación			
TNFα (pg/ml)	19,6 ± 6,5	18,3 ± 6,9	22,3 ± 14,6
IL-6 (pg/ml)	49,4 ± 14,9	21,9 ± 7,9	106,1 ± 39,6
IL-8 (pg/ml)	180,5 ± 56,9	101,8 ± 55,8	337,9 ± 122,8
Estrés Oxidativo			
MDA (μM/l)	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,58	3,0 ± 0,7
Prostaglandina F2α (pg/ml)	346,8 ± 49,6	296,9 ± 43,8	394,7 ± 81,2
¹ estallido significativo con respecto a bajo			
² significativo con respecto al control			

TABLA 2

	Child C (n = 27)	Child B (n = 26)	Child A (n = 10)	control (n = 13)
estallido en reposo %	67,0 ± 6,5 ^{1,2,3}	38,2 ± 7,2 ^{1,3}	36,0 ± 9,0 ¹	8,9 ± 2,7
% de estallido después de estimulación - estallido en reposo	32,4 ± 6,8 ^{1,2,3}	57,5 ± 7,0 ^{1,3}	60,4 ± 8,7 ¹	76,8 ± 7,7
% de fagocitosis	105,9 ± 2,8	110,18 ± 3,3	107 ± 5,5	99,4 ± 7,5
% de GMFI	50,7 ± 9,5 ¹	87,1 ± 13,6	104,6 ± 17,1	101,0 ± 9,2
1 p < 0,05 con respecto a control				
2 p < 0,05 con respecto a Child B				
3 p < 0,05 con respecto a Child A				

TABLA DE INFECCIONES

Infecciones positivas de cultivo documentadas en pacientes estudiados									
estallido elevado					estallido bajo				
primer organismo			segundo organismo		primer organismo			segundo organismo	
paciente	día	organismo	día	organismo	paciente	día	organismo	día	organismo
1	4	EC	29	MRSA	2	16	EC		
4	14	EC	19	CNS	14	23	<i>E.coli</i>		
5	9	CNS	34	EC	17	9	MRSA		
7	4	EC	10	CNS	23	15	<i>St. aureus</i>		
12	2	<i>C. albicans</i>			33	15	<i>Propionibacterium</i>	34	CNS
13	10	<i>St. aureus</i>							
15	8	CNS							
20	5	EC	5	CNS					
35	6	EC							
36	4	CNS	4	EC					
45	2	CNS	3	CNS					
48	20	<i>E.coli</i>							
61	6	<i>C. albicans</i>							
62	7	<i>C. albicans</i>	9	EC					

EC: Enterococo, MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, CNS: Estafilococo negativo para coagulasa, St.: Estafilococo, Str.: Estreptococo, C.: Candidia

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el pronóstico en un individuo que padece cirrosis alcohólica, método que comprende

5 (a)

(i) poner en contacto una muestra de plasma de dicho individuo con una población de neutrófilos normales que no son de dicho individuo, para producir una población de ensayo de neutrófilos y

10 (ii) proporcionar una muestra de control que comprende una población de neutrófilos normales que no son de dicho individuo en el que dicha muestra de control no se pone en contacto con dicha muestra de plasma,

(b) evaluar la capacidad de fagocitosis de la población de ensayo de neutrófilos de (a) (i),

(c) comparar dicha capacidad de fagocitosis de (b) con la capacidad de fagocitosis de dicha muestra de control de neutrófilos de (a)(ii),

15 en el que un nivel más bajo de fagocitosis de neutrófilos en dicha población de ensayo, en comparación con el nivel de fagocitosis de neutrófilos en dicha muestra de control es indicativo de un pronóstico de infección y/o insuficiencia orgánica y/o mortalidad.

20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicha muestra de control de (a)(ii) es una muestra de sangre completa o una fracción de una muestra de sangre completa que comprende dicha población de células de neutrófilos.

25 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la etapa (b) comprende la evaluación de

(a) el número total de neutrófilos dentro de la muestra que presentan fagocitosis,

(b) la proporción de neutrófilos dentro de la muestra que presentan fagocitosis,

30 (c) el número total de bacterias que se fagocitan cuando se ponen en contacto con la muestra de neutrófilos, o

(d) el número de células que un neutrófilo individual o una población de neutrófilos son capaces de fagocitar.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende:

35 (a) etiquetado de un material a fagocitar

(b) permitir que se produzca fagocitosis

(c) cuantificar y/o localizar la etiqueta para indicar la cantidad de fagocitosis que se ha producido.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que dicho material a fagocitar son células.

40 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que dicho material etiquetado a fagocitar son bacterias *E. coli* opsonizadas etiquetadas con FITC.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el individuo que padece cirrosis alcohólica también padece hepatitis alcohólica.

45

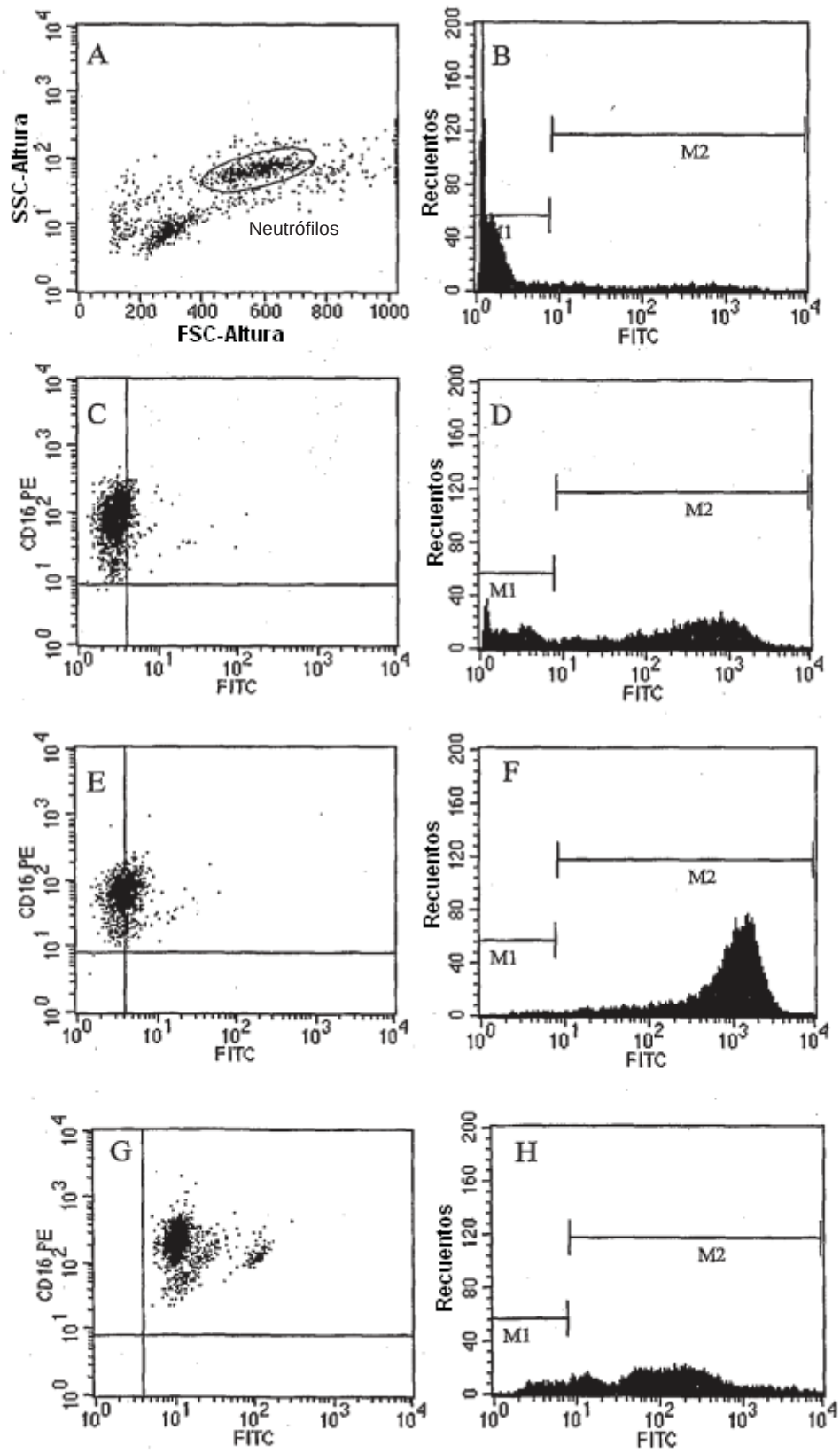


Figura 1

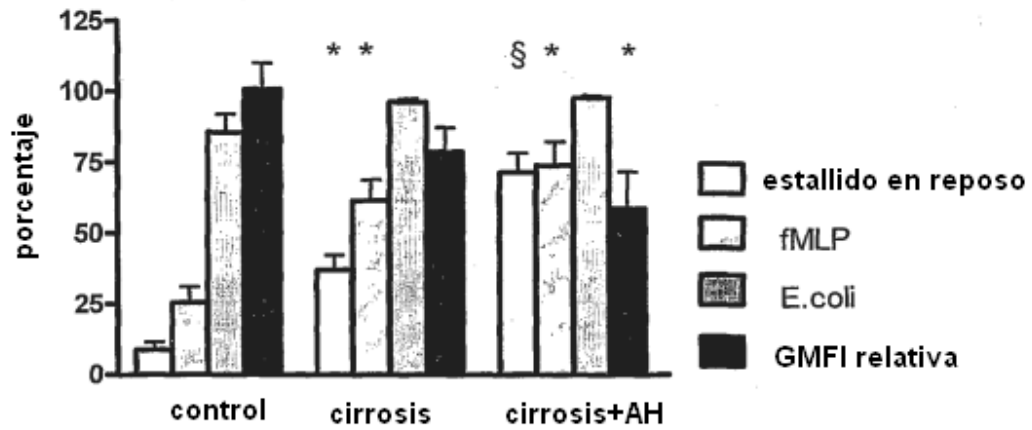


Figura 2

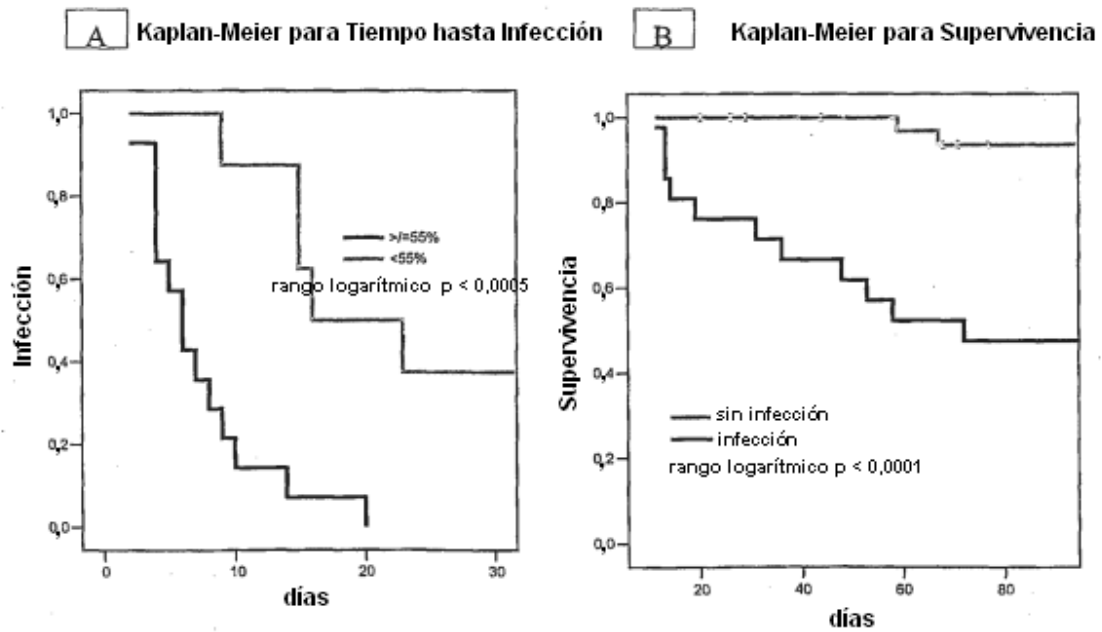


Figura 3

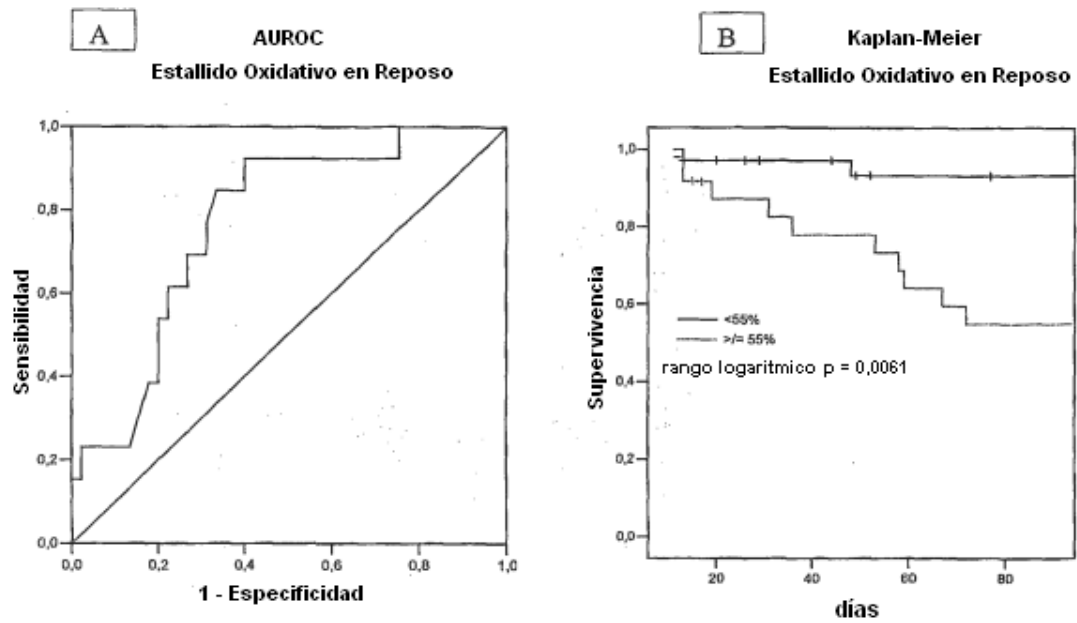


Figura 4

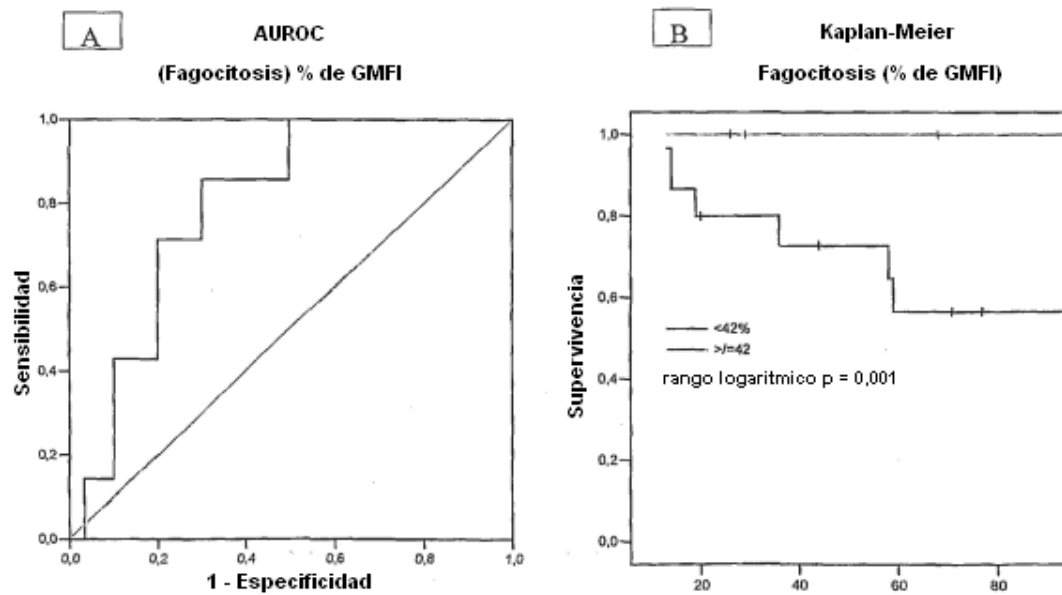


Figura 5

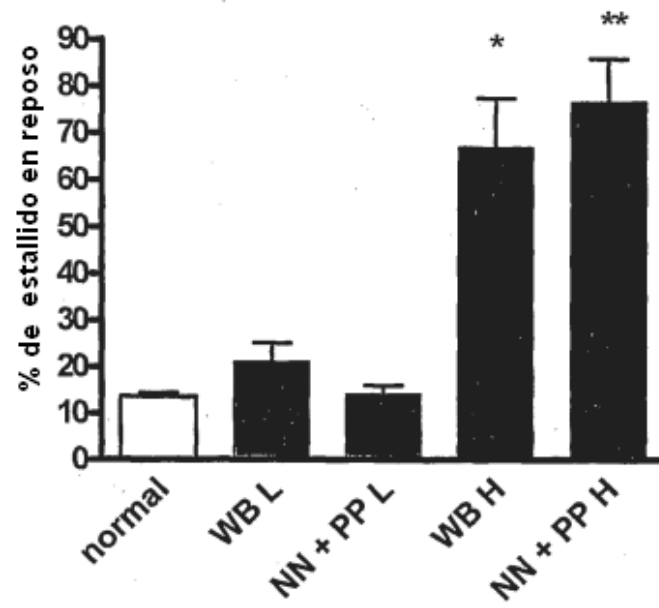


Figura 6

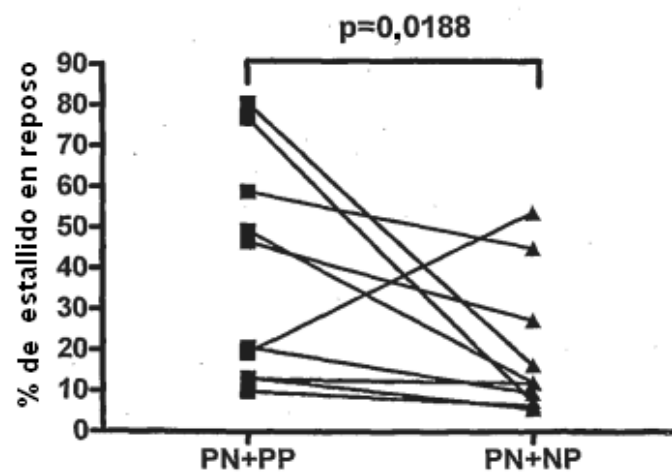


Figura 7

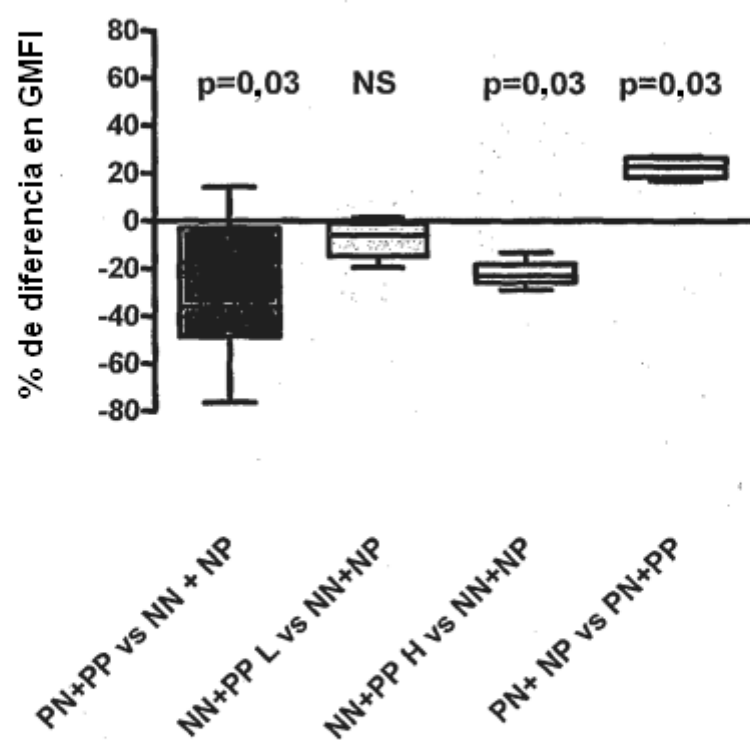


Figura 8

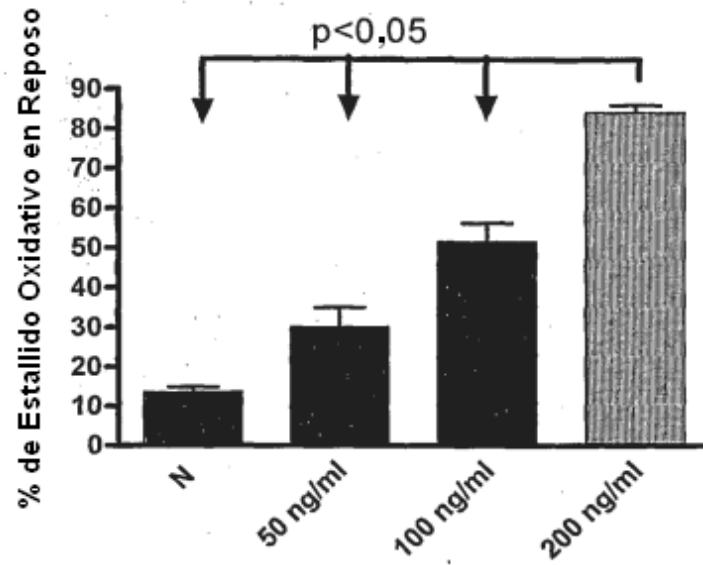


Figura 9

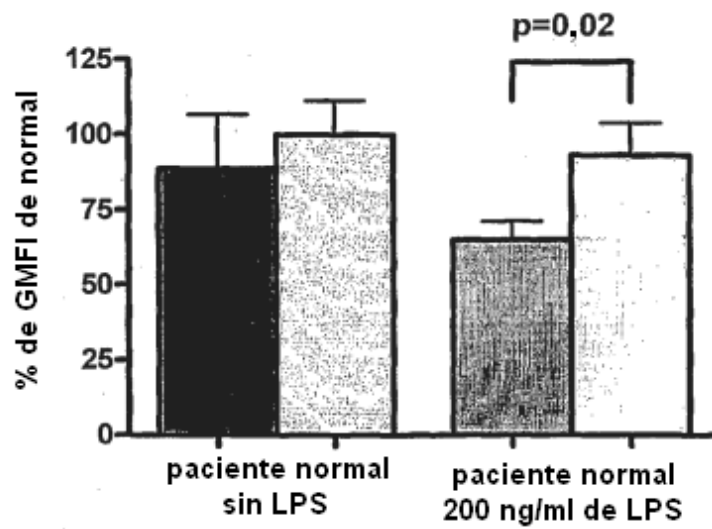


Figura 10

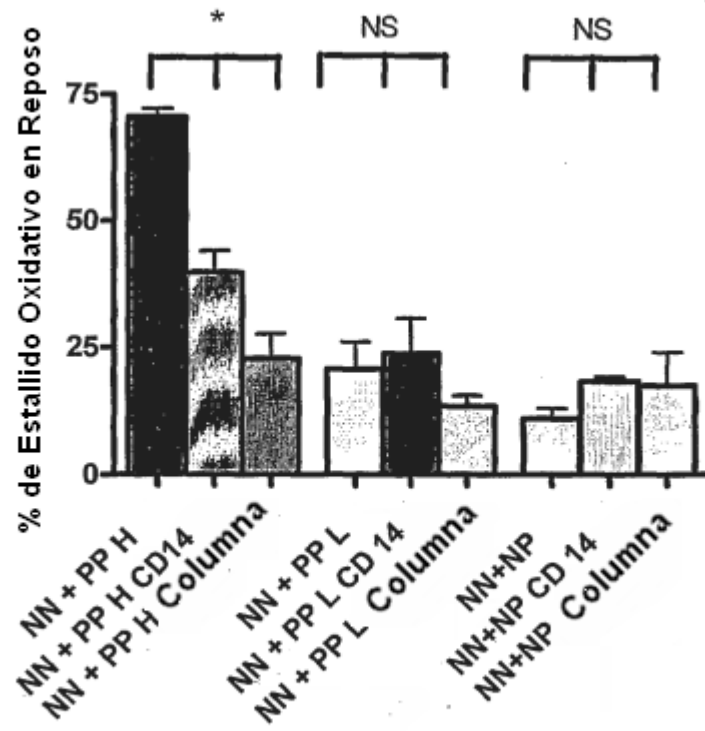


Figura 11

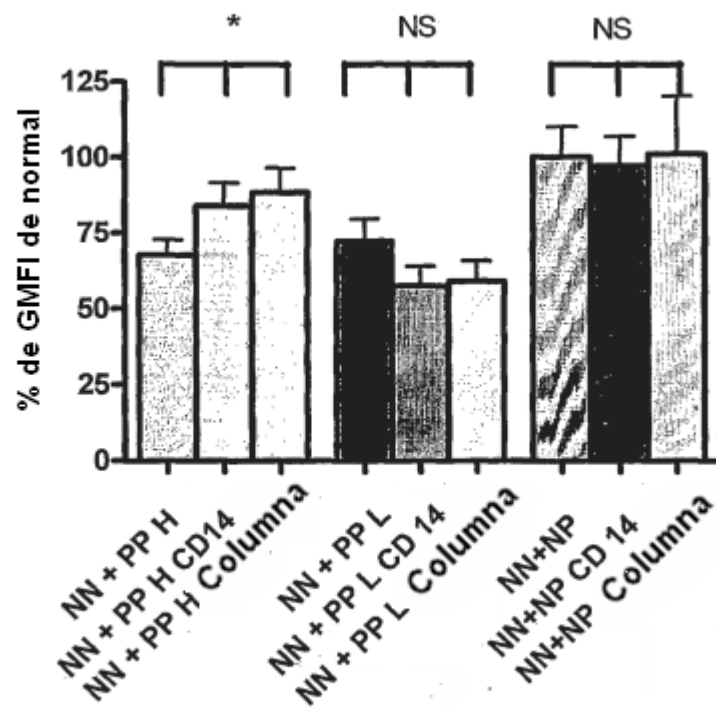


Figura 12

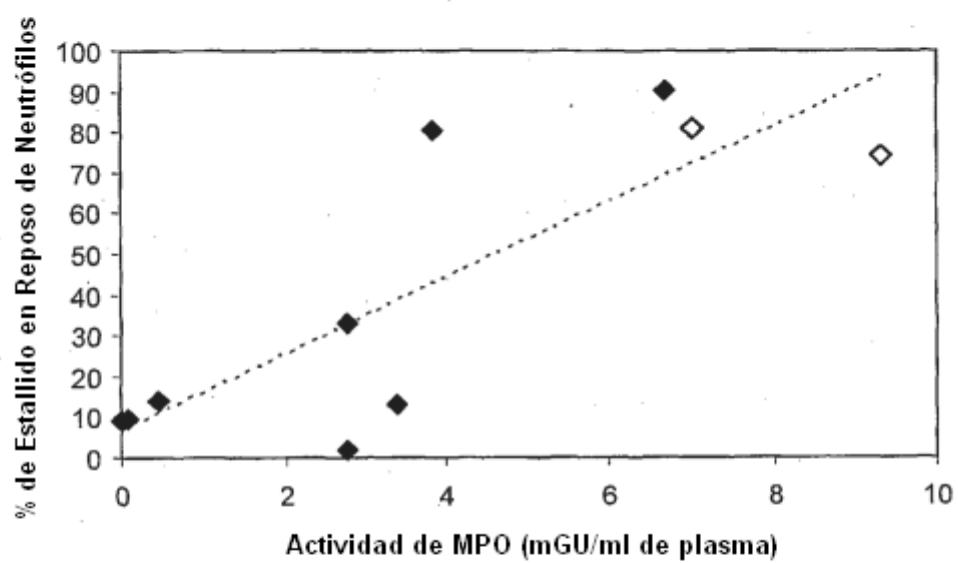


Figura 13