

Multi-omic data integration study of immune system alterations in the development of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis

Una alta proporción de pacientes con cirrosis hepática desarrollan encefalopatía hepática mínima (EHM), un síndrome neuropsiquiátrico que produce déficits de atención, deterioro cognitivo e incoordinación motora. La EHM reduce la calidad y la duración de la vida de los pacientes y produce elevados costos económicos para los sistemas sanitarios, siendo un importante problema socioeconómico actual. Aunque la etiología de la EHM no se conoce por completo, se ha demostrado que la aparición de alteraciones leves en la cognición y coordinación de los pacientes con EHM se debe a la acción sinérgica tanto de la hiperamonemia como de la inflamación periférica, derivadas de la insuficiencia hepática.

El objetivo principal de este trabajo fue conocer las alteraciones inmunológicas asociadas a la inflamación periférica que desencadenan deterioro cognitivo en los pacientes cirróticos. Estos cambios pueden ser monitorizados como cascadas de señalización a lo largo de los tipos celulares del sistema inmune. Como estudio preliminar, se analizaron los cambios en la expresión génica (transcriptómica), los metabolitos de plasma (metabolómica) y un panel de citoquinas extracelulares en muestras de sangre de pacientes cirróticos con y sin EHM. Los resultados del análisis transcriptómico apoyaron la hipótesis de alternancias en las poblaciones celulares de linfocitos Th1/Th2 y Th17 como principales impulsores de la EHM. El análisis clúster de las moléculas del suero dio como resultado 6 grupos de compuestos químicamente similares, sugiriendo módulos funcionales que operan durante la inducción de la EHM. También se ha realizado un análisis de integración multiómica para detectar las relaciones entre los componentes intra y extracelulares que podrían contribuir a la inducción del deterioro cognitivo. Los resultados de este análisis integrativo sugirieron una relación entre las citocinas CCL20, CX3CL1, CXCL13, IL-15, IL-22 e IL-6 con la alteración de la quimiotaxis, así como un vínculo entre los fosfolípidos insaturados de cadena larga y el aumento del transporte de ácidos grasos y la producción de prostaglandinas.

Estudios previos sugieren que un cambio en la inflamación periférica, orquestado principalmente por las células T CD4⁺, es un factor crítico que desencadena el deterioro cognitivo en EHM. Así, la segunda parte de la tesis se centró en la comprensión de las rutas genéticas y los mecanismos por los que las alteraciones en los linfocitos CD4⁺ pueden contribuir a la inflamación periférica en EHM. Se analizaron los niveles de expresión de genes, factores de transcripción y miARNs en este subtipo de linfocitos mediante secuenciación de alto rendimiento (RNA-seq y miRNA-seq). El análisis individual de cada grupo de datos mostró las diferencias de expresión de ARNm y miARN, así como las vías biológicas alteradas en los linfocitos CD4⁺ comparando pacientes cirróticos con y sin EHM. Encontramos alteraciones en 167 ARNm y 20 rutas biológicas en los pacientes con EHM, incluyendo los receptores tipo Toll, la señalización de la IL-17 y las vías del metabolismo de la histidina y el triptófano. Trece miRNAs y siete factores de transcripción presentaron alteraciones en los pacientes con EHM. Después utilizamos bases de datos para determinar sus genes diana, los cuales resultaron ser codificantes para proteínas clave implicadas en el cambio inmunológico que desencadena la EHM. Por ejemplo, la modulación por el aumento de miR-494-3p, miR-656-3p y miR-130b-3p de la expresión de TNFAIP3 (proteína A20) y ZFP36 (proteína TTP) aumentaría los niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-17 y TNF α .

La última parte de la tesis comprende un supuesto práctico en el que se estudia el repertorio de receptores de células T (TCR) de pacientes control, y de pacientes cirróticos con y sin EHM, a partir del conjunto de datos de RNA-seq procedentes de células T CD4⁺ aisladas previamente. Dado que los experimentos de RNA-seq contienen genes del TCR en una fracción de los datos, se crea una oportunidad para el análisis del repertorio sin necesidad de generar datos adicionales, lo que reduce la cantidad y los costes de las muestras. Tras el alineamiento de las lecturas con la base de datos de los genes VDJ realizada por la herramienta MiXCR, recuperamos con éxito entre 498-1114 cadenas TCR beta distintas por paciente en nuestros datos. Además, estudiar los perfiles del repertorio TCR puede ayudar a comprender el estado inmunológico de los pacientes con EHM. Los resultados mostraron un bajo número de clones públicos (convergencia clonal), una alta diversidad (expansión clonal) y una elevada similitud en la arquitectura de la secuencia dentro de los repertorios, independientemente del estado inmunitario de los tres grupos de pacientes. Además, detectamos una sobrerrepresentación significativa de los TCRs relacionados con la enfermedad celíaca y la enfermedad inflamatoria intestinal en los repertorios de los pacientes con EHM. Cabe destacar que este es uno de los pocos estudios que muestran

el análisis paso a paso de los repertorios TCR utilizando lecturas del transcriptoma completo como datos de partida.

En conclusión, nuestro trabajo identifica los mecanismos moleculares de los cambios en el sistema inmune asociados a la aparición de EHM en pacientes cirróticos. Sin embargo, se requieren trabajos futuros para validar estos resultados utilizando una mayor cohorte de pacientes que permita la determinación de biomarcadores y el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces para los pacientes con EHM.