



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 353 835**

⑮ Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **07804163 .9**

⑯ Fecha de presentación : **07.09.2007**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **2059817**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

⑭ Título: **Biomarcadores para evaluar la función hepática.**

⑩ Prioridad: **07.09.2006 GB 0617581**

⑬ Titular/es: **UCL Business plc.**  
**Tjhe Network Building**  
**97 Tottenham Court Road**  
**London, W1T 4TP, GB**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.03.2011**

⑭ Inventor/es: **Jalan, Rajiv;**  
**Mookerjee, Rajeshwar P y**  
**Davies, Nathan**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.03.2011**

⑭ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 353 835 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****Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para evaluar la función hepática, en particular para predecir la evolución clínica de la enfermedad hepática.

**5 Antecedentes de la invención**

Las estadísticas del NIH sugieren que hay más de 3000 pacientes con insuficiencia hepática fulminante por año en los Estados Unidos. Si estos datos se extrapolan para incorporar la creciente carga de enfermedad hepática viral y alcohólica en Occidente y también en el mundo subdesarrollado, el número de casos supera millones por año en todo el mundo.

10 Con la creciente incidencia global de enfermedad hepática de fase terminal secundaria a lesión por alcohol, la hepatitis viral y la entidad más recientemente identificada de enfermedad hepática grasa no alcohólica, y una falta de aumento significativo del conjunto de donantes de trasplante hepático, ha aumentado marcadamente la necesidad de identificar los individuos con rápido deterioro de la función hepática que requieren tratamientos de soporte y de intervención.

15 Mookerjee et al (Hepatology (2005) 42: Suppl. 1, Abstract 755) informan una correlación entre los niveles plasmáticos combinados de las metilargininas ADMA y SDMA y la mortalidad a 28 días en los pacientes cirróticos con hepatitis alcohólica (AH).

**Compendio de la invención**

20 Los inventores examinaron pacientes con cirrosis alcohólica descompensada y han establecido que los niveles plasmáticos de dos metilargininas en el plasma, dimetilarginina asimétrica (ADMA) y su estereoisómero de dimetilarginina simétrica (SDMA) son significativamente superiores en los pacientes con hepatitis alcohólica y en los no sobrevivientes.

25 La suma combinada del ADMA y SDMA plasmáticos, denominada puntuación de dimetilarginina (DAS), fue también un mejor pronosticador de la evolución clínica en los pacientes cirróticos alcohólicos que otros sistemas de puntuación biológica conocidos o dimetilarginina sola.

30 Por consiguiente, los niveles elevados de metilargininas representan marcadores biológicos importantes de la evolución nociva en los pacientes con hepatitis alcohólica, en los que también existe una alta incidencia de falla orgánica y sepsis. Estos marcadores se pueden usar como un pronosticador confiable de la progresión y la evolución en los pacientes con enfermedad hepática, los que se someten a trasplante hepático y en los pacientes con falla multiorgánica y sepsis.

35 Los inventores han establecido además que, en los pacientes con enfermedad hepática alcohólica, los pacientes que mueren tienen una relación de albúmina modificada por isquemia (IMA): albúmina (o "IMAR") significativamente aumentada.

40 A pesar de que los niveles de metilarginina, DAS e IMAR son indicadores de marcadores para la progresión y evolución de la enfermedad, los inventores han hallado que la combinación de la medición de metilarginina con IMAR como biomarcador combinado mejora la utilidad predictiva de mala evolución y, en consecuencia, que tal combinación proporciona una utilidad predictiva para evaluar el riesgo de mortalidad. En particular, los inventores han hallado que la combinación del DAS con IMAR como un biomarcador combinado ("DASIMAR") proporciona una utilidad predictiva excelente para evaluar el riesgo de mortalidad.

45 De acuerdo con la presente invención, en consecuencia se proporciona un método para evaluar la función hepática en un individuo, tal método comprende determinar el nivel combinado de ADMA y SDMA y la relación de albúmina modificada por isquemia (IMA): albúmina (IMAR) en el individuo, donde el método se lleva a cabo en una muestra del individuo.

**45 Breve descripción de los dibujos**

50 La Figura 1 muestra niveles de ADMA en pacientes y voluntarios sanos: (a) Pacientes con cirrosis con hepatitis alcohólica sobreañadida (AH+C+) tienen valores significativamente superiores de ADMA ( $P<0,001$ ) en comparación con pacientes con cirrosis sola (AH- C+). Todos los pacientes cirróticos tenían valores significativamente superiores de ADMA en comparación con voluntarios normales ( $P<0,001$ ). (b) Los sobrevivientes de los pacientes hospitalizados con cirrosis descompensada ( $n=39$ ) tenían valores significativamente inferiores de ADMA que los que murieron ( $n=13$ );  $P<0,001$ . (c) Los sub-análisis de pacientes demostraron mayores niveles de ADMA en sobrevivientes AH+C+ ( $n=15$ ) en comparación con sobrevivientes AH-C+ ( $n=24$ );  $P<0,01$ . Los niveles de ADMA fueron superiores en pacientes AH+C+ que murieron ( $n=12$ ) en comparación con sobrevivientes AH+C+;  $P<0,05$

- 5 La Figura 2 muestra niveles de SDMA en pacientes y voluntarios sanos: (a) los pacientes AH+C+ tienen niveles de SDMA significativamente superiores ( $P<0,001$ ) en comparación con pacientes AH-C+. No hubo diferencia en los niveles de SDMA entre los pacientes AH-C+ y voluntarios sanos. (b) Los sobrevivientes de los pacientes hospitalizados con cirrosis descompensada ( $n=39$ ) tenían valores significativamente inferiores de SDMA que los que murieron ( $n=13$ );  $P<0,001$ . (c) Los sub-análisis de pacientes demostraron mayores niveles de SDMA en los pacientes AH+C+ que murieron ( $n=12$ ) en comparación con sobrevivientes AH+C+;  $P<0,01$ . Los sobrevivientes AH+C+ ( $n=15$ ) también tenían valores de SDMA superiores en comparación con sobrevivientes AH-C+ (cirrótico no inflamatorio) ( $n=24$ );  $P<0,01$ .
- 10 10 La Figura 3 muestra ADMA en comparación con SDMA: Un gráfico de ADMA versus SDMA en los pacientes AH+C+ demuestra que en el valor límite para SDMA de 0,9  $\mu\text{mol/L}$  derivado de las curvas receptor-operador, el número de muertes predichas por ADMA mediante el uso de un valor límite de 0,65  $\mu\text{mol/L}$ , no está representado (indicado por el área sombreada), lo que sugiere un beneficio potencial de una puntuación combinada de ADMA+SDMA (DAS) para determinar la evolución.
- 15 15 La Figura 4 muestra el porcentaje de cambio de la puntuación de dimetilarginina (DAS) durante el curso de la admisión en sobrevivientes y no sobrevivientes. Esta Figura muestra el aumento del porcentaje del valor DAS [ADMA+SDMA] en los pacientes AH+C+ no sobrevivientes ( $n=12$ ) en comparación con los valores de 18 pacientes sobrevivientes, que incluyen 6 pacientes AH+C+, en los que hubo una disminución neta en el valor de DAS ( $P<0,01$ ).
- 20 20 La Figura 5 muestra curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de la puntuación de dimetilarginina (DAS) de admisión: La Figura muestra un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier que compara la mortalidad hospitalaria en todos los pacientes cirróticos alcohólicos estudiados, sobre la base del valor de admisión de DAS  $< 1,23$  o  $> 1,23$  ( $P<0,0005$ ). Una puntuación de DAS mayor aumenta significativamente el riesgo de mortalidad hospitalaria.
- 25 25 La Figura 6 muestra curvas receptor-operador calculadas para las puntuaciones pronósticas-Función Discriminante (DF), puntuación de Child-Pugh, Modelo para la Enfermedad Hepática de Fase Terminal (MELD) y la Puntuación de Dimetilarginina (DAS) en pacientes con hepatitis alcohólica (AH+C+): Las curvas ROC para DF, Child-Pugh, MELD y DAS se muestran con el área bajo la curva (AUROC) listado. Es evidente a partir de estas Figuras que en el subgrupo de pacientes AH+C+, el valor de DAS proporciona el factor pronóstico más confiable de mortalidad (AUROC =0,84), mediante el uso de un límite de DAS de 1,52; esto da una sensibilidad de 73% y una especificidad de 83%.
- 30 30 La Figura 7 muestra la expresión de proteína DDAH II y PRMT-1: se muestran transferencias Western representativas para la expresión de dimetilarginina-dimetilaminohidrolasa-II (DDAH-II) y proteína-arginina-metiltransferasa-1 (PRMT-1) en los pacientes AH+C+ y AH-C+ estudiados, junto con sus correspondientes transferencias de proteína  $\alpha$ -Tubulina, para controlar la carga del gel. Una cuantificación de las densidades de DDAH II y PRMT-1 sobre las transferencias Western de todas las biopsias de pacientes evaluados se representa en las barras de columna para pacientes AH+C+ y AH-C+, que han sido corregidas para una expresión de  $\alpha$ -Tubulina. Los pacientes AH+C+ tienen una expresión de DDAH II significativamente menor ( $P<0,01$ ) y la expresión de PRMT-1 significativamente superior ( $P<0,01$ ).
- 35 35 La Figura 8 muestra que los pacientes cirróticos alcohólicos descompensados que mueren tienen una relación IMA/A1b significativamente aumentada, en comparación con los sobrevivientes, que probablemente refleja el empeoramiento de la gravedad de la enfermedad y el mayor índice de inflamación en estos pacientes. Este punto se ilustra en el panel inferior donde se puede observar que los pacientes con el componente inflamatorio adicional de hepatitis alcohólica (AH) tienen un mayor DAS e IMAR que los cirróticos estables; los sobrevivientes de AH tienen menores puntuaciones DASIMAR que los que mueren con progresión de su enfermedad.
- 40 40 La Figura 9 muestra las curvas receptor-operador de supervivencia para IMAR y DASIMAR, respectivamente. Se puede observar que la utilidad predictiva es mayor para DASIMAR que IMAR sola, lo cual nosotros sugerimos que se relaciona con las contribuciones sinérgicas y adicionales a la patología al sumar las dos puntuaciones predictivas, DAS y IMAR, lo que refleja inflamación y cambios hemodinámicos además de gravedad progresiva de la disfunción hepática, a medida que se evoluciona a falla hepática y multiorgánica.
- 45 45 La Figura 10 muestra la representación matemática de los 3 componentes de la puntuación DASIMAR (a saber ADMA, SDMA e IMAR) y demuestra claramente la razón para combinar las puntuaciones DAS e IMAR para identificar cuáles pacientes sensibles es poco probable que sobrevivan. En la Figura, los puntos gris medio (observados en los valores mayores del eje IMAR) revelan el plano matemático que muestra que los pacientes alcohólicos que mueren, distinguibles claramente de los sobrevivientes y los que tienen solo cirrosis.
- 50 50 La Figura 10 muestra la representación matemática de los 3 componentes de la puntuación DASIMAR (a saber ADMA, SDMA e IMAR) y demuestra claramente la razón para combinar las puntuaciones DAS e IMAR para identificar cuáles pacientes sensibles es poco probable que sobrevivan. En la Figura, los puntos gris medio (observados en los valores mayores del eje IMAR) revelan el plano matemático que muestra que los pacientes alcohólicos que mueren, distinguibles claramente de los sobrevivientes y los que tienen solo cirrosis.
- 55 55 La Figura 10 muestra la representación matemática de los 3 componentes de la puntuación DASIMAR (a saber ADMA, SDMA e IMAR) y demuestra claramente la razón para combinar las puntuaciones DAS e IMAR para identificar cuáles pacientes sensibles es poco probable que sobrevivan. En la Figura, los puntos gris medio (observados en los valores mayores del eje IMAR) revelan el plano matemático que muestra que los pacientes alcohólicos que mueren, distinguibles claramente de los sobrevivientes y los que tienen solo cirrosis.
- 60 60 La Figura 10 muestra la representación matemática de los 3 componentes de la puntuación DASIMAR (a saber ADMA, SDMA e IMAR) y demuestra claramente la razón para combinar las puntuaciones DAS e IMAR para identificar cuáles pacientes sensibles es poco probable que sobrevivan. En la Figura, los puntos gris medio (observados en los valores mayores del eje IMAR) revelan el plano matemático que muestra que los pacientes alcohólicos que mueren, distinguibles claramente de los sobrevivientes y los que tienen solo cirrosis.

La Figura 11 muestra las curvas ROC para IMAR, DAS y DASIMAR obtenidas de los estudios realizados en ratas tratadas con galactosamina (Sigma, Poole RU) por inyección intraperitoneal (IP) a razón de 1 g/kg (n=22) seguido 24 horas después por estímulo adicional en un subgrupo al que se administró lipopolisacárido (LPS - *Klebsiella pneumonia*, n=11) IP a razón de 1 mg/kg.

5

#### Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprendido" o "que comprende", se entenderán que implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

10

La referencia a cualquier técnica previa en esta memoria descriptiva no es, y no se debe tomar como una declaración o cualquier forma de sugerencia de que la técnica previa forma parte del conocimiento general en Australia u otra parte.

15

En la actualidad las puntuaciones pronósticas usadas para la insuficiencia hepática carecen de especificidad, lo que se relaciona parcialmente con el uso de variables clínicas sujetas a las diferencias del observador. Estas puntuaciones también incorporan parámetros biológicos tales como bilirrubina y tiempo de protrombina, cuyos ensayos varían entre los laboratorios, mientras que otros parámetros biológicos tales como la creatinina son afectados por el estado nutricional y la colestasis en pacientes con lesión hepática progresiva.

20

En consecuencia se necesita hallar un marcador específico y sensible de disfunción hepática progresiva que permanece independiente de las variables clínicas y biológicas, que están sujetas a la variación dependiente del estado del paciente y el laboratorio. Este marcador también debería reflejar la evolución de la patología, con referencia específica a la inflamación y disfunción orgánica.

La presente invención se basa en una combinación de dos tipos de marcadores, ADMA y SDMA combinados y albúmina modificada por isquemia (IMA).

25

Existen dos argininas metiladas en plasma, dimetilarginina asimétrica [ADMA] y su estereoisómero dimetilarginina simétrica [SDMA]. La medición de metilarginina puede abarcar la medición de una o más metilargininas tal como una o ambas de estas dimetilargininas. Por ejemplo, la medición de metilarginina es la medición de ADMA y SDMA combinados, lo que da una puntuación de dimetilarginina (DAS) combinada.

30

Los inventores han determinado que la medición de las dimetilargininas, productos de las modificaciones de la proteína pos-traduccionales normales, mediante el uso de una puntuación de dimetilarginina combinada (puntuación DAS) permite superar las deficiencias de los sistemas de puntuación biológicos usados actualmente, mientras que también refleja la evolución de la patología con una utilidad predictiva confiable de mortalidad temprana (28 días) de insuficiencia hepática, como se demuestra en un reciente estudio piloto.

Una puntuación DAS se calcula a partir de la suma de los valores medidos de ADMA y SDMA. Los estudios de los inventores sugieren que estas dos variables reflejan ambos estados inflamatorios e identifican la evolución temprana de la falla orgánica (Figura 1). Además, los pacientes que mueren tienen un porcentaje significativo de aumento de ADS en comparación con los sobrevivientes, en los que hay una reducción relativa (Figura 4).

Los inventores han demostrado que el uso de estas mediciones actúa como un factor pronóstico confiable de evolución en los pacientes con insuficiencia hepática aguda, que incluye cambios con trasplante hepático, así como en los que tienen ACLF. Se considera que la aplicación de esta prueba o puntuación ayuda a definir los pacientes con insuficiencia hepática progresiva en los que se justifica la intervención temprana con sistemas de soporte del hígado, en comparación con las puntuaciones pronósticas disponibles en la actualidad (DF, MELD, Child-Pugh). (véase Figura 6: curvas ROC).

50

Su uso también se puede extender a (i) una población de pacientes que esperan el trasplante para clasificar la utilización de órganos para el trasplante o para determinar la función del órgano después del trasplante hepático ortóptico, (ii) paciente con falla multiorgánica y sepsis con disfunción hepática, en el que se podría usar un método que se describe en la presente, tal como un método que evalúa el valor de DAS combinado, para predecir la evolución mala.

Las potenciales ventajas del sistema de puntuación de metilarginina o DAS son que este involucra una medición altamente precisa de las metilargininas ubicuas que no son dependientes de la ingesta nutricional (como la creatinina) ni de las variaciones del ensayo a través de los continentes como ocurre con el uso de la medición de tiempo de protrombina aplicado en los sistemas de puntuación actuales. La medición de DAS tampoco es dependiente de las variables clínicas y su

5 cálculo matemático se puede derivar en el lecho del enfermo, sin la necesidad de computación. Los sistemas de medición validados actualmente incluyen el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento y/o espectrometría de masa para obtener separaciones reproducibles y confiables entre los estereoisómeros. Sin embargo, se puede determinar una medición de metilarginina o una puntuación DAS mediante el uso de cualquier método adecuado, por ejemplo en la forma de un ensayo que se podría realizar en el lecho del enfermo, mediante el uso de un ELISA lo que puede simplificar la medición dentro de un establecimiento clínico.

10 Debido a que los niveles variados de albúmina en el hígado de los pacientes están determinados en parte por la nutrición y en gran parte por la función de síntesis del hígado residual, los inventores han modificado la aplicación del ensayo de unión a albúmina-cobalto al factor en una relación de IMA a la albúmina nativa en el suero- una relación de IMA:albúmina sérica, o "IMAR". Los datos de una serie de 52 pacientes con enfermedad hepática alcohólica descompensada sugieren que los pacientes que mueren tienen una relación de IMA:albúmina significativamente aumentada ( $P<0,01$ ). Además, como con el valor de metilarginina o DAS, hay una sugerencia de que el IMAR 15 puede reflejar el estado inflamatorio y de este modo la evolución patológica subyacente de la enfermedad (véase la Figura 8). Mediante el uso de las curvas receptor-operador para predecir la mortalidad, se halló que el área bajo la curva es 0,73 ( $\pm 0,06$ ) para la cohorte estudiada, lo que sugiere que el IMAR puede ser una prueba predictiva útil de la mortalidad en estos pacientes.

20 Sin embargo, los inventores han hallado que una combinación de una medición de metilarginina (tal como DAS) con IMAR como un biomarcador combinado aumenta la utilidad predictiva de la evolución mala. Una combinación de la puntuación DAS con IMAR lleva a un AUROC de 0,91 ( $\pm 0,04$ ) con intervalos de confianza de 95% de 0,81-0,99, y una sensibilidad de 74% y especificidad de 92%. Esto proporciona una excelente utilidad predictiva para evaluar el riesgo de mortalidad. (Figura 9), mientras que también refleja el empeoramiento de la falla orgánica e inflamación, los elementos de la fisiopatología de la insuficiencia hepática, que se pueden dirigir con las intervenciones específicas tales como diálisis de albúmina y terapias para reducir la inflamación. El método de la invención (DASIMAR) en consecuencia se puede usar potencialmente para controlar la respuesta a la intervención.

25 30 Por consiguiente, las metilargininas (tales como DAS) e IMAR son sugerencias de marcadores para la progresión de la enfermedad y se pueden usar en combinación. La invención en consecuencia se relaciona con un método para evaluar la probabilidad de disfunción hepática progresiva y el desarrollo de falla multiorgánica.

35 40 La evaluación de la función hepática puede ser útil en una amplia variedad de situaciones. Por ejemplo, el método permite distinguir los pacientes con disfunción hepática de los que no tienen disfunción hepática. En consecuencia, la progresión de la enfermedad hepática se puede controlar mediante el uso del método de la invención; en particular se pueden identificar pacientes que es probable que sufran de una evolución nociva. Es decir, el método de la invención se puede usar para predecir la evolución de la enfermedad hepática.

45 50 El método de la invención también se puede usar entre otros para evaluar la función hepática en el postrasplante hepático, evaluar la función hepática en la lesión de la reperfusión en un postrasplante hepático del injerto o evaluar la función hepática en pacientes que desarrollan falla multiorgánica y sepsis.

55 60 La insuficiencia hepática es la etapa final de la enfermedad hepática. La insuficiencia hepática se divide en tipos que dependen de la rapidez del comienzo. 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 tan enfermo y funciona tan mal, que la encefalopatía es evidente. Cualquier enfermedad hepática progresiva puede producir insuficiencia hepática; los ejemplos incluyen: toxicidad al acetaminofeno, cirrosis, hepatitis viral, y cáncer hepático metastásico. Otros signos de la enfermedad hepática tal como ictericia, fetor hepaticus, y falla de coagulación indican que el hígado tiene problemas para realizar sus funciones fisiológicas normales, pero no se denomina *insuficiencia hepática* hasta que aparezcan los cambios de estado mental.

65 70 El pronóstico para los pacientes con enfermedad hepática es difícil de estimar ya que la afección tiene muchas causas. De acuerdo con la invención, sin embargo, es posible predecir la evolución clínica de la enfermedad hepática, en particular en pacientes con insuficiencia hepática aguda, así como en los que tienen ACLF. También puede ser posible identificar la evolución temprana de la falla orgánica. Además, se pueden identificar los pacientes con insuficiencia hepática progresiva en los que se justifica la intervención temprana. Los cambios involucrados en los trasplantes hepáticos también se pueden identificar mediante el uso del método de la invención.

75 80 Por consiguiente, el método de la invención se puede realizar en un individuo cuyo hígado

está descompensado o que muestra características de encefalopatía hepática. El hígado del individuo puede estar en estado compensado. El individuo puede tener enfermedad hepática crónica. El individuo puede tener cirrosis hepática, por ejemplo con o sin hepatitis alcohólica. El individuo puede tener insuficiencia hepática aguda. El individuo puede tener encefalopatía hepática.

5 El comienzo de la enfermedad hepática tanto aguda como crónica puede deberse a una causa xenobiótica. Por ejemplo, el individuo puede haber estado expuesto a un agente químico, fármaco o algún otro agente que causa daño hepático. El individuo puede tener una reacción a un fármaco de venta sin receta, de venta con receta o droga "con fines recreativos" que causa daño hepático. El individuo puede haber estado tomando Rezulin™ (troglitazona; Parke-Davis), Serzone™ (nefazodona; Bristol-Myers Squibb) u otros fármacos que se sabe que causan daño hepático. El individuo puede ser uno que tomó una sobredosis de un fármaco particular o que excedió la dosis recomendada de un fármaco capaz de causar daño hepático. Por ejemplo, el individuo puede haber tomado una sobredosis de paracetamol. El individuo puede haber estado expuesto a agentes químicos que pueden causar daño hepático tal como, por ejemplo, en su lugar de trabajo. Por ejemplo, el individuo puede haber estado expuesto a tales agentes químicos en un contexto industrial o agrícola. El individuo puede haber consumido plantas que contienen compuestos que pueden causar daño hepático, en particular este puede ser el caso en que el individuo es un animal, tal como un herbívoro. Por ejemplo, el individuo puede haber consumido una planta que contiene el alcaloide pirrolizidina tal como hierba cana. El individuo puede haber estado expuesto a toxinas ambientales que se sabe que causan enfermedad hepática.

10 La toxicidad hepática relacionada con fármacos comprende más del 50% de todos los casos de enfermedad hepática aguda (insuficiencia hepática aguda). La toxicidad por acetaminofeno (también conocido como paracetamol y N-acetil-p-aminofenol) es la causa más común de insuficiencia hepática aguda en los Estados Unidos y Gran Bretaña. Los consumidores de alcohol moderados a fuertes a largo plazo que toman acetaminofeno en dosis terapéuticas o modestamente excesivas están en riesgo de lesión hepática aguda y posiblemente insuficiencia hepática aguda. El uso de alcohol potencia los efectos tóxicos del acetaminofeno. La toxicidad idiosincrática del fármaco también contribuye a la insuficiencia hepática aguda.

15 20 25 30 La toxicidad idiosincrática del fármaco se piensa que es una respuesta de hipersensibilidad donde el individuo responde a un fármaco de una manera farmacológicamente anormal. Esta respuesta anormal puede llevar a la insuficiencia hepática aguda.

35 40 La insuficiencia hepática aguda o enfermedad hepática crónica puede ser causada por la infección con un organismo patogénico. Por ejemplo, la enfermedad hepática se puede deber a una infección viral. En particular, el individuo puede estar infectado, o haber estado infectado, con un virus que causa hepatitis. El individuo puede tener hepatitis viral crónica. El virus por ejemplo, puede ser virus de hepatitis B, C o D. En algunos casos, y en particular cuando el individuo tiene hepatitis viral, el individuo también puede estar infectado con VIH I o II. El individuo puede tener SIDA. Es posible que el individuo pueda haber estado o estar infectado con otros organismos que causan enfermedad hepática y en particular los que están presentes en el hígado durante alguna fase de su ciclo vital. Por ejemplo, el individuo puede tener, o haber tenido parásitos hepáticos.

45 50 55 60 El individuo puede tener una enfermedad heredada que causa, o aumenta el riesgo de, enfermedad hepática crónica. Por ejemplo, el individuo puede tener una o más de hemocromatosis hepática, enfermedad de Wilson o deficiencia de α-1-antitripsina. El individuo puede tener un trastorno heredado que causa alguna clase de anormalidad estructural o funcional en el hígado que aumenta la probabilidad de fibrosis hepática. El individuo puede estar genéticamente predisposto a desarrollar un trastorno autoinmune que daña el hígado y en consecuencia que puede contribuir a la fibrosis hepática.

La enfermedad hepática crónica puede ser inducida por el alcohol. Un hombre o mujer tratado puede ser o haber sido, un alcohólico. Él o ella pueden estar o haber estado consumiendo en promedio 50 o más unidades de alcohol por semana, 60 o más unidades de alcohol por semana, 75 o más unidades de alcohol por semana y aún 100 o más unidades de alcohol por semana. El hombre o la mujer pueden estar o haber estado consumiendo en promedio hasta 100 unidades de alcohol por semana, hasta 150 unidades de alcohol por semana y aun hasta 200 unidades de alcohol por semana. La medición de una unidad de alcohol difiere de país a país. Aquí, una unidad equivale a 3 gramos de etanol de acuerdo con el estándar del Reino Unido.

El hombre o la mujer pueden 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 tales niveles de alcohol durante hasta 10 años, hasta 20 años, hasta 30 años y incluso hasta 40 años. En casos de cirrosis hepática inducida por alcohol el individuo puede ser por ejemplo, de 25 años o más, 35 años o más, 45 años o más e incluso más de 60 años.

5 El individuo puede ser varón o mujer. Las mujeres pueden ser más sensibles a los efectos adversos del alcohol que los hombres. Las mujeres pueden desarrollar enfermedad hepática crónica alcohólica en un marco de tiempo más corto y a partir de cantidad menores de alcohol que los hombres. Parece no existir un factor único para el aumento de sensibilidad al daño hepático en las mujeres, pero el efecto de las hormonas sobre el metabolismo del alcohol puede cumplir un papel importante.

10 En consecuencia, el individuo puede estar sufriendo de hepatitis alcohólica. La hepatitis alcohólica puede variar de hepatitis leve, con pruebas de laboratorio anormales que son la única indicación de enfermedad, a disfunción hepática grave con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por la retención de bilirrubina), encefalopatía hepática, ascitis, várices esofágicas sangrantes, coagulación sanguínea anormal y coma.

15 En el método de la invención, el individuo puede tener una o más de numerosas afecciones conocidas por producir daño hepático tal como, por ejemplo, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica autoinmune, y/o esquistomiasis (infección parasítica). El individuo puede tener o haber tenido un bloqueo del conducto biliar. En algunos casos, la causa subyacente de la enfermedad hepática puede ser desconocida. Por ejemplo el individuo puede haber sido diagnosticado como portador de cirrosis criptogénica. Por consiguiente, se puede sospechar que el individuo tenga cualquiera de las afecciones listadas en la presente.

20 Los métodos para diagnosticar enfermedad hepática tal como insuficiencia hepática aguda y encefalopatía hepática son bien conocidos en la técnica y en particular para los médicos y veterinarios en el campo. Preferiblemente, el individuo será diagnosticado como portador de una enfermedad hepática y encefalopatía hepática, por ejemplo por un profesional médico o veterinario. El individuo puede exhibir uno o más síntomas asociados con la enfermedad hepática tal como uno o más de ictericia, ascitis, cambios cutáneos, retención de líquido, cambios en las uñas, propensión a formar hematomas, sangrados nasales, várices esofágicas, y en individuos masculinos pueden tener agrandamiento de mamas. El individuo puede presentar agotamiento, fatiga, pérdida de apetito, náusea, debilidad y/o pérdida de peso. El individuo también puede presentar uno o más síntomas asociados con encefalopatía hepática tal como uno o más de confusión, desorientación, demencia, estupor, coma, edema cerebral, falla multiorgánica (insuficiencia respiratoria, insuficiencia cardiovascular o insuficiencia renal), agarrotamiento/rigidez muscular, convulsiones o alteración del lenguaje. El individuo tratado puede o no tomar otros fármacos para tratar la enfermedad hepática. El individuo tratado puede tener riesgo de desarrollar encefalopatía hepática.

25 30 35 La enfermedad hepática puede haber sido o ser confirmada por examen físico que incluye las técnicas tales como ultrasonido. Pueden haberse tomado biopsias hepáticas para buscar la formación 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 está comprometida en el individuo. Se pueden caracterizar la naturaleza y la causa subyacente de la enfermedad hepática. Se puede determinar cualquier antecedente de exposición a los agentes causantes de la enfermedad hepática.

40 45 50 El individuo tratado puede estar en riesgo de episodios encefalopáticos hepáticos, por ejemplo, pacientes que están a la espera de trasplantes hepáticos, pacientes quirúrgicos y/o de hipertensión portal. Una persona con riesgo para episodios encefalopáticos hepáticos es una persona que no ha sufrido ningún episodio encefalopático hepático o no ha sufrido ningún episodio encefalopático hepático durante un período extendido de tiempo (aproximadamente 12 semanas o más), pero tiene un trastorno o condición médica que origina un riesgo de episodios encefalopáticos hepáticos. Un episodio encefalopático hepático es una afección clínica caracterizada por la presencia de disfunción cerebral en pacientes con enfermedad o disfunción hepática. Existe un amplio espectro de alteraciones mentales en la encefalopatía hepática que varía de mínimos cuando los principales efectos son una reducción de la calidad de vida, a máxima que lleva al coma y por último a la muerte.

55 60 El método de la invención se puede aplicar para controlar la disfunción hepática, es decir, como una prueba de función hepática, en el contexto de, por ejemplo, (i) posttrasplante hepático - los inventores han mostrado que después que los pacientes con insuficiencia hepática aguda se han trasplantado, existe una progresiva reducción del ADMA y un descenso más lento de SDMA reflejado en una puntuación DAS inferior; (ii) lesión de la reperfusión en un injerto después del trasplante hepático; (iii) pacientes enfermos críticos en UTI que desarrollan falla multiorgánica-disfunción hepática pueden ser un conductor primario y, en consecuencia, el método de la invención puede identificar esto temprano y rastrear el progreso de este, es decir, puede predecir los que probablemente progresen a falla orgánica (por ejemplo, 1, 2 o 3 órganos) y mueran. Por consiguiente, el individuo en el que se practica el método de la invención puede ser un paciente con trasplante hepático, un individuo que sufre de lesión por reperfusión, por ejemplo en un injerto después del trasplante hepático o una paciente con riesgo de desarrollar o que ha desarrollado falla multiorgánica.

En el método de la invención, el nivel de ADMA y SDMA combinados e IMAR se determina en una muestra del individuo.

- 5       Normalmente el método se lleva a cabo *in vitro* en una muestra del individuo. La muestra generalmente será de un tejido conocido por contener metilarginina(s) e IMA y albúmina. La muestra normalmente comprende un fluido corporal del individuo y en consecuencia, puede ser por ejemplo, suero. En forma alternativa o adicional, la muestra puede comprender orina, líquido cefalorraquídeo o tejido hepático. Tales muestras se pueden obtener de una manera apropiada. Los métodos para obtener suero y tejido hepático son bien conocidos por los expertos en la técnica.
- 10      Los niveles de metilarginina(s) en un individuo, en particular ADMA y SDMA, se pueden medir de un modo conveniente. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el nivel de metilarginina(s) de una muestra se puede medir mediante el uso de espectrometría de masa en tandem por electroaspersión dilución isotópica estable de fragmentación específica, o por extracción de intercambio iónico seguida por HPLC con detección de fluorescencia. Otras técnicas de detección incluyen electroforesis capilar.
- 15      IMAR también se puede determinar por cualquier método conveniente conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la prueba de púrpura de bromocresol Abbott AeroSet (BCP) se puede usar para la medición de la albúmina sérica. La concentración de IMA posteriormente se puede determinar por la adición de una cantidad conocida de Co(II) a un espécimen de suero y la medición del Co(II) no unido por un ensayo colorimétrico mediante el uso de ditiotreitol.
- 20      El nivel de metilargininas individual o en combinación, (por ejemplo ADMA+SDMA = puntuación DAS), e IMAR se puede usar para predecir la evolución clínica de la enfermedad hepática en el individuo.
- 25      Preferiblemente, el método usado para determinar el nivel de metilarginina(s) (tal como ADMA y SDMA) e IMAR será uno que sea posible de realizar en forma rápida y económica. El método usado puede ser el que es posible de realizar en el lecho del enfermo de modo de simplificar la medición dentro de un establecimiento clínico. Por ejemplo, se puede usar un kit de ensayo tal como ELISA para medir el nivel de metilargininas o para determinar IMAR.
- 30      Una puntuación DAS se calcula a partir de la suma de los valores medidos de las 2 argininas metiladas en plasma (dimetilarginina asimétrica [ADMA] y su estereoisómero dimetilarginina simétrica [SDMA]). Estas dos variables reflejan el estado inflamatorio e identifican la evolución temprana de la falla orgánica. Los pacientes que mueren tienen un porcentaje de aumento significativo de DAS en comparación con los sobrevivientes, en los que existe una reducción relativa.
- 35      Por consiguiente, en el método de la invención una elevada puntuación DAS, en comparación con la puntuación equivalente en un paciente que no sufre de la enfermedad hepática o un sobreviviente de la enfermedad hepática, es un factor pronóstico confiable de la progresión a falla orgánica o, más críticamente, evolución nociva, es decir, mortalidad.
- 40      Una puntuación elevada de DAS, en consecuencia actúa como un factor pronóstico confiable de evolución en pacientes con insuficiencia hepática aguda, que incluyen los cambios con el trasplante hepático, así como en los que tienen ACLF.
- 45      Se considera que la aplicación de esta puntuación elevada (en comparación con los individuos con enfermedad no hepática o sobrevivientes de la enfermedad hepática) ayuda a definir a los pacientes con insuficiencia hepática progresiva en los que se justifica la intervención temprana con sistemas de soporte del hígado. También, tales puntuaciones elevadas se pueden usar para seleccionar individuos de una población de candidatos que reciben trasplantes hepáticos.
- 50      Los pacientes con enfermedad hepática alcohólica que mueren tienen una relación significativamente aumentada de IMA:albúmina en comparación con los sobrevivientes. Además, como con el valor de DAS, IMAR parece reflejar el estado inflamatorio y por lo tanto la evolución patológica subyacente de la enfermedad. Por consiguiente, IMAR puede ser una prueba predictiva útil de progresión de la enfermedad hepática, y, en particular, la mortalidad de estos pacientes.
- 55      Una combinación de una puntuación de dimetilarginina (DAS) con IMAR como un biomarcador combinado, mejora la utilidad predictiva de la evaluación mala, con un AUROC de 0,91 ( $\pm 0,04$ ) con intervalos de confianza de 95% de 0,81-0,99, y una sensibilidad de 74% y especificidad de 92%. Esto proporciona una excelente utilidad predictiva para evaluar el riesgo de mortalidad, mientras que también refleja el empeoramiento de la falla orgánica e inflamación, los elementos de la fisiopatología de la insuficiencia hepática, que pueden ser dirigidos con intervenciones específicas tales como diálisis de albúmina y terapias para reducir la inflamación.

Por consiguiente, un nivel elevado de metilarginina(s), en comparación con el nivel de

- metilarginina(s) en un individuo que no sufre de la enfermedad hepática o en un individuo que es un sobreviviente de la enfermedad hepática, es indicativo de una progresión de la enfermedad hepática, deterioro de la función hepática, aumento de riesgo de mortalidad en el individuo.
- 5 Un aumento en el nivel combinado de ADMA y SDMA, en comparación con el nivel combinado de ADMA y SDMA en un individuo que no sufre de la enfermedad hepática o en un individuo que es un sobreviviente de la enfermedad hepática, es indicativo de una progresión de la enfermedad hepática, deterioro de la función hepática, aumento de riesgo de mortalidad en el individuo.
- 10 Un aumento del IMAR, en comparación con IMAR en un individuo que no sufre de la enfermedad hepática o en un individuo que es un sobreviviente de la enfermedad hepática, también es indicativo de una progresión de la enfermedad hepática, deterioro de la función hepática, aumento de riesgo de mortalidad en el individuo.
- 15 En los métodos descriptos anteriormente, un aumento del nivel de metilarginina(s), tal como un aumento en el nivel combinado de ADMA y SDMA, y un aumento en IMAR, en comparación con un individuo que no sufre de la enfermedad hepática o en un individuo que es un sobreviviente de la enfermedad hepática, es indicativo de una progresión de la enfermedad hepática, deterioro de la función hepática, aumento de riesgo de mortalidad en el individuo.
- 20 En forma ideal, una puntuación DAS (o una puntuación componente de este) o una puntuación DASIMAR debe ser predictiva de una evolución específica tal como mortalidad, es decir, en forma ideal los expertos podrían determinar la evolución clínica, por ejemplo supervivencia o muerte, sobre la base de tales puntuaciones.
- 25 Una curva receptor operador característica (ROC) puede permitir obtener esto. Tales curvas exploran la relación entre la sensibilidad y especificidad de una prueba clínica, tal como DAS o DASIMAR, para una variedad de diferentes puntos de corte, en consecuencia permite la determinación de un punto de corte óptimo, es decir, será conveniente seleccionar un punto de corte por encima del cual, se indica una evolución nociva de la enfermedad hepática y por debajo del cual se indica supervivencia.
- 30 Las mediciones usadas comúnmente del desempeño de una prueba clínica son sensibilidad y especificidad. La sensibilidad es la probabilidad de que la enfermedad (o evolución en el caso de la presente invención) se diagnostica cuando está presente realmente y especificidad es la probabilidad de identificar que la enfermedad está ausente cuando está adecuadamente ausente. En forma ideal, tanto la sensibilidad como la especificidad deberían ser uno. Sin embargo, la modificación del punto de corte para tratar de aumentar la sensibilidad y especificidad usualmente producirá una disminución de la otra.
- 35 La curva ROC es una técnica gráfica para establecer el punto de corte óptimo. A fin de construir una curva ROC se necesita calcular la sensibilidad y especificidad para cada posible valor de punto de corte. Para realizar el gráfico ROC, el eje X es 1 menos la especificidad y el eje Y es la sensibilidad. Se traza una línea diagonal desde la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. Este gráfico refleja las características de una prueba sin poder discriminante. Cuanto más se acerca el gráfico a la esquina superior izquierda mejor es la discriminación entre casos y no casos. Un índice de la bondad de la prueba es el área debajo de la curva – el valor más cercano a este es el de mejor poder discriminante de la prueba.
- 40 Por consiguiente, se puede usar una curva ROC para establecer un punto de corte para una puntuación DAS (o puntuación componente de este) o una puntuación DASIMAR. Una puntuación por encima del punto de corte puede ser indicativa de evolución nociva tal como mortalidad, mientras que una puntuación por debajo del punto de corte puede ser indicativa de una evolución no nociva tal como supervivencia.
- 45 El punto de corte se puede seleccionar de acuerdo con los requerimientos de la prueba, por ejemplo, si es más importante excluir los falsos positivos o si es más importante identificar todos los positivos verdaderos. En el caso de una prueba para identificar los pacientes admitidos con insuficiencia hepática que morirán, es importante que todos los pacientes sean identificados en tal caso el punto de corte también puede identificar numerosos falsos positivos.
- 50 En el método de la invención, un punto de corte puede indicar una evolución particular de la enfermedad hepática, tal como supervivencia, o ser indicativa de la progresión de la enfermedad hepática, por ejemplo comienzo de enfermedad hepática aguda.
- 55 Un punto de corte apropiado puede ser identificado por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se ha demostrado que un punto de corte de DAS de 1,52 es un factor pronóstico útil cuando se evalúa la supervivencia en los pacientes que sufren de cirrosis alcohólica con hepatitis alcohólica.

5 El método de la invención se puede realizar en combinación con uno o más sistemas de puntuación adicionales usados para evaluar la severidad de la 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 del método de la invención. Tales sistemas de puntuación adicionales incluyen el sistema de puntuación Child-Pugh, Criterios de West Haven, Escala de Coma de Glasgow o sistema de puntuación Child-Pugh modificado. En forma alternativa, o adicional se puede usar el sistema de puntuación DF, SOFA, MELD o APACHE II. Los puntos se asignan a parámetros que incluyen niveles de bilirrubina sérica, niveles de albúmina sérica y a los signos que incluyen presencia de ascitis o encefalopatía. Los sujetos tratados se pueden clasificar en Child-Pugh clase A, B o C. En general los sujetos tratados se clasifican en Child-Pugh clase C.

10 Un kit de ensayo puede ser adecuado para predecir la evolución de la enfermedad hepática en un individuo, tal kit de ensayo comprende el medio para determinar el nivel de una o más metilargininas e IMAR en el individuo.

15 Un kit de ensayo también puede comprender un agente útil en el tratamiento de la enfermedad hepática.

20 A kit de ensayo opcionalmente puede comprender, buffers apropiados, enzimas, por ejemplo una polimerasa termoestable tal como Taq polimerasa y/o polinucleótidos control. Un kit de la invención también puede comprender un envase apropiado e instrucciones de uso en un método para predecir la evolución de la enfermedad hepática en el individuo.

25 El método de la invención permite la identificación de un individuo que tiene aumento del riesgo de mortalidad. También puede permitir controlar la progresión de la enfermedad hepática respecto de los efectos de intervención determinados, es decir, se puede controlar la eficacia del tratamiento de la enfermedad hepática en un individuo. En consecuencia, el método se puede realizar numerosas veces con respecto al mismo individuo y tratamiento para evaluar la efectividad de un curso de tratamiento para la enfermedad hepática.

30 Los individuos identificados como portadores de un aumento de riesgo de mortalidad posteriormente se pueden tratar conforme a ello.

35 Un método de tratamiento de la enfermedad hepática puede comprender determinar si el individuo presenta o no un aumento de riesgo de mortalidad mediante el uso del método que se describió anteriormente y posteriormente se administra al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente útil en el tratamiento de la enfermedad hepática.

40 Un agente que es útil en el tratamiento de la enfermedad hepática se puede usar en o en la fabricación de un medicamento para usar en, un método de tratamiento de la enfermedad hepática en un individuo, en donde se ha identificado el individuo que sufre de un aumento de riesgo de mortalidad mediante el uso del método expuesto anteriormente.

45 En consecuencia, la afección de un individuo identificado como portador de un aumento de riesgo de mortalidad se puede mejorar por la administración de un agente que se usa en el tratamiento de la enfermedad hepática. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que se usa en el tratamiento de la enfermedad hepática se puede dar a un individuo identificado de acuerdo con un método de la invención.

50 Aun cuando un individuo sea identificado como portador de un aumento de riesgo de mortalidad, la progresión a insuficiencia hepática completa puede ser irreversible. En este caso, se pueden adoptar pasos para lenticular la declinación de la función hepática. La dieta del paciente puede estar restringida. El consumo de proteínas normalmente se mantendrán en los niveles óptimos: si es demasiado alto, puede causar disfunción cerebral, pero demasiado poco causa pérdida de peso. El alcohol se puede evitar completamente y el consumo de sodio se puede mantener bajo para prevenir la ascitis, la acumulación de fluido en el abdomen. La diálisis hepática puede ser apropiada. El trasplante hepático es el tratamiento definitivo para la insuficiencia hepática, pero no es una opción para todos los pacientes y el suministro de hígados es limitado. Por consiguiente, el método de la invención se puede usar para clasificar potenciales receptores de trasplantes de hígado; se puede identificar la mayor parte del riesgo de muerte. Pueden darse medicaciones, tales como lactulosa para aliviar los síntomas de la insuficiencia hepática.

55 Un agente que se usa en el tratamiento de la enfermedad hepática se puede administrar en una variedad de formas de dosis. En consecuencia, un agente se puede administrar por vía oral, por ejemplo como comprimidos, pastillas, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables. El agente que se usa para tratar la enfermedad también se puede administrar por vía parenteral, sea subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica o por técnicas de infusión. El agente también se puede administrar en la forma de un supositorio. Un médico

podrá determinar la vía de administración requerida para cada paciente particular.

- 5 La formulación de un agente usado en el tratamiento de la enfermedad hepática dependerá de los factores tales como la naturaleza del agente exacto, sea destinado a uso farmacéutico o veterinario, etc. Un agente que se usa para tratar la enfermedad hepática se puede formular para uso simultáneo, separado o sucesivo.
- 10 Un agente usado en el tratamiento de la enfermedad hepática se formula normalmente para la administración con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. El portador o diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica. Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio, y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes; por ejemplo almidones, goma arábiga, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes desagregantes, por ejemplo almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato de almidón sódico; mezclas efervescentes; pigmentos; edulcorantes; agentes humectantes, tal como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en las formulaciones farmacéuticas. Tales preparaciones farmacéuticas se pueden fabricar de manera conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezclado, granulación, formación de comprimidos, revestimiento con azúcar o revestimiento con película.
- 15 20 Las dispersiones líquidas para la administración oral pueden ser jarabes, emulsiones o suspensiones. Los jarabes pueden contener como portadores, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.
- 25 Las suspensiones y emulsiones pueden contener como portador, por ejemplo una goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para las inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo propilenglicol, y si se desea, una cantidad adecuada de hidrocloruro de lidocaína.
- 30 35 Las soluciones para administración o infusión intravenosa pueden contener como portador, por ejemplo, agua estéril o preferiblemente pueden estar en forma de soluciones salinas isotónicas, acuosas y estériles.
- 40 Una cantidad terapéuticamente efectiva de agente usado en el tratamiento de la enfermedad hepática se puede administrar a un paciente que ha sido identificado como portador de enfermedad hepática mediante el uso del método de la invención. La dosis de un agente que se usan en el tratamiento de la enfermedad hepática se puede determinar de acuerdo con varios parámetros, en especial de acuerdo con la sustancia usada; la edad, peso y afección del paciente tratado; la vía de administración; y el régimen requerido.
- 45 Nuevamente, un médico podrá determinar la ruta requerida de administración y dosis para cualquier paciente particular. Una dosis diaria típica es de aproximadamente 0,1 a 50 mg por kg de peso corporal, de acuerdo con la actividad del inhibidor específico, la edad, peso y afecciones del individuo tratado, el tipo y severidad de la degeneración y la frecuencia y vía de administración. Preferiblemente, los niveles de dosis diarias son de 5 mg a 2 g.
- 50 Un agente adecuado se puede usar en la fabricación de un medicamento para usar en un método de tratamiento de la enfermedad hepática en un individuo, en donde se ha identificado el individuo que sufre de la enfermedad hepática de acuerdo con el método de la invención que se describió anteriormente.
- 55 En consecuencia, un método para el tratamiento de la enfermedad hepática en un individuo puede comprender: (i) determinar si el individuo tiene un riesgo de mortalidad mediante el uso de un método de la invención descripto anteriormente; y (ii) administrar a un individuo identificado en (i) con riesgo de mortalidad, una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente descripto antes.
- Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención:

## Ejemplos

**Ejemplo 1: El aumento de los niveles de dimetilarginina se asocia con evolución clínica adversa en hepatitis alcohólica grave (no es parte de la invención)**

## ***Métodos***

- 5 **Diseño del estudio:** Todos los pacientes o sus parientes dieron consentimiento o  
asentimiento informado escrito, respectivamente, de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la  
Asociación Médica Mundial, 1989, y el estudio fue aprobado por el comité de ética local. Se incluyeron  
pacientes con evidencia de una descompensación aguda de la enfermedad hepática alcohólica (ascitis  
creciente, edema del pie o ictericia progresiva) con evidencia clínica y radiológica de cirrosis, y con  
una historia actual de abuso de alcohol (consumo de alcohol >80 g de alcohol/día para hombres y >60  
g/día para mujeres hasta el momento de admisión). Se excluyeron pacientes si tenían <18 o >75 años  
y presentaban evidencia de: etiología de la enfermedad hepática adicional o diferente; disfunción  
cardíaca severa o insuficiencia renal (creatinina >150 µmol/L); neoplasia hepática/extrahepática;  
encefalopatía hepática Grado 2 (con exclusión del consentimiento informado), y si hubo evidencia  
microbiológica (cultivo de orina, sangre, esputo y ascitis) indicativa de infección después de 72 horas  
de terapia antibiótica de amplio espectro.

Los pacientes se estudiaron en el momento de la biopsia hepática transjugular (dentro de los días 1-3 de admisión), realizada para evaluar la gravedad de la disfunción hepática en los pacientes con ascitis y/o coagulopatía. Los pacientes se clasificaron como portadores de hepatitis alcohólica superpuesta con cirrosis (AH+C+) en un examen histológico posterior. Los criterios histológicos usados para definir AH+C+ incluyeron la presencia de: degeneración baloniforme de hepatocitos; cuerpos de Mallory; infiltración de neutrófilos y cuerpos acidófilos apoptóticos.<sup>18</sup> Todos los pacientes recibieron terapia de soporte que incluye, nutrición: 2000kCal/día con 72 g de proteína/día; suplemento de vitamina: 1 cápsula de multivitamina y 200 mg de tiamina por día después de la suplementación con vitamina B parenteral inicial (Pabrinex intravenosa tres veces diarias durante 2 días). El tratamiento conducido por el protocolo local se inició durante el desarrollo de las complicaciones que incluyen, sepsis (antimicrobianos después del cultivo); síndrome hepatorenal (terlipressin 0,5-2 mg por vía intravenosa hasta seis veces por día en conjunto con 60 g de albúmina pobre en sales [20 g/ 100 ml]); falla orgánica (soporte de cuidado intensivo completo que incluye hemofiltración y/o ventilación, tal como se indica). Debido al debate en curso sobre el uso de tratamientos con corticoides y anticuerpo anti-TNF en el RU para la hepatitis alcohólica aguda, ninguno de los pacientes recibió estas terapias durante el estudio.

**Mediciones:** Se realizaron estudios hemodinámicos después de un ayuno toda la noche y una hora de período de reposo supino. Los pacientes se sedaron durante el procedimiento mediante el uso de Midazolam (dosis media de 4 mg; Phoenix Pharma Ltd., Gloucester, RU), y se realizó el control de frecuencia cardíaca y presión arterial durante el estudio. Se estableció una puntuación del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) para cada paciente<sup>19</sup> mediante el uso de los criterios: temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$ ; una frecuencia cardíaca  $> 90$  latidos/minuto; taquipnea  $>20$  respiraciones/minuto; recuento de leucocitos  $>12 \times 10^9/\text{L}$  o  $< 4 \times 10^9/\text{L}$  o la presencia de más de 10% de neutrófilos inmaduros.

**45 Gradiente de presión venosa hepática (HVPG):** Un catéter de balón de oclusión Berenstein 5Fr (Boston Scientific, Cork, Irlanda) se introdujo por medio de la vía yugular interna derecha en la vena hepática derecha bajo análisis fluoroscópico (Toshiba Spot Film Device Model: SA-900U; Tochigi-ken, Japón). Las mediciones de presión venosa hepática en cuña y libre, realizadas por triplicado, se registraron por medio de conjuntos transductores de presión (Medex Medical, Rossendale, Lancashire, RU) en un monitor Hewlett Packard (Modelo 86S, HP, EE.UU.). HVPG se calculó como la diferencia entre la presión venosa hepática en cuña y libre.

**Muestreo y ensayos:** Se recolectó sangre de una arteria y vena hepática en tubos heparinizados/ revestidos con EDTA preelefados (Becton Dickenson, Drogheha, Irlanda). Se midió hematología de rutina, bioquímica hepática y proteína C reactiva en todos los pacientes. La creatinina plasmática se evaluó por espectrometría de masa dadas las dificultades de precisión del ensayo de Jaffe en los estados colestáticos. Se separaron muestras de plasma adicionales por centrifugación y el plasma se almacenó a -80° C para el análisis posterior de citoquinas, quimioquinas y ADMA. El tejido hepático obtenido se fijó con formalina o se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C para la evaluación posterior de la concentración de ADMA en tejido y para la estimación de proteína de PRMT 1 y DDAH II. Las muestras de sangre extraídas de un grupo "control" de 12 voluntarios sanos (9 varones), sin antecedentes de exceso de alcohol y sin antecedentes médicos pasados se usaron para evaluar intervalos "normales" para ADMA y SDMA.

**Citoquinas/quimioquinas:** Se midieron TNF $\alpha$ , interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8) y receptores de TNF solubles I y II (TNF-RI, TNF-RII) mediante el uso de kits de ensayo comerciales

(BioSource, Nivelles, Bélgica) como se describió previamente.<sup>21</sup> Se estimó que el límite inferior de detección es 5 pg/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue 4,5-5,5 %.

5 **ADMA:** Se midió ADMA plasmático mediante el uso de espectrometría de masa en tandem por electroaspersión dilución isotópica estable de fragmentación específica. Las muestras (50 µl) se desproteinizaron con acetonitrilo que contiene <sup>2</sup>H<sub>6</sub>-ADMA, se cromatógrafió (acetonitrilo:agua, 1:1, con 0,025% de ácido fórmico) en una columna de protección Teicoplanin de 10 mm x 2,1 mm ID (Chirobiotic T, ASTEC Ltd, Congleton, RU), y se analizó mediante el uso de un SCIEX API4000 (Applied Biosystems, Warrington, RU) en modo de control de reacción múltiple ion positivo. El tiempo de adquisición fue 2,5 min con un tiempo de inyección a inyección de < 3 min. La imprecisión dentro del ensayo para ADMA fue 2,1% a una concentración de 0,37 gmol/l. La impresión interensayo para ADMA fue 7,4%, 5,8%, y 5,1% a concentraciones de 0,39, 1,15, y 3,96 µmol/l, respectivamente.

10 Los homogenizados de tejido se prepararon a partir de tejido de hígado congelado inmediatamente en buffer HEPES helado (20 mM, pH 7,4) que contiene EDTA (1 mM); sacarosa (250 mM); valina (60 mM); cóctel inhibidor de proteasa (a razón de 1 ml/20 g de tejido, que contiene: 15 fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencensulfonilo (AEBSF), pepstatinA, E-64, bestatina, leupeptina, y aprotinina; Sigma-Aldrich Co, RU); y PMSF (3,4mg/ml). Esto se centrifugó (1000 g, 10 min, 4°C) y el sobrenadante se retuvo y se midió el contenido de proteína mediante el uso del método de Biuret.<sup>22</sup> Los sobrenadantes de estas preparaciones se extrajeron y se analizaron para determinar ADMA mediante el uso del método descrito anteriormente, pero mediante el uso de 10 µl de cada muestra de homogenizado. Las concentraciones de ADMA del tejido se expresaron como micromoles por milígramo de proteína.

20 **Análisis de transferencia Western DDAH y PRMT:** Se evaluaron especímenes de biopsia de los últimos 8 pacientes (4 con AH+C+ comprobada y 4 con cirrosis alcohólica sola) para la 25 cuantificación de DDAH y PRMT. El tejido de hígado homogenizado congelado se resuspendería en 100 µl de buffer de lisis (PBS, pH 6,6, que contiene 0,1% de SDS, 0,5% de desoxicolato de sodio y 1% de Nonidet). Después de la determinación de la concentración de proteína, se separaron 30 µg de 30 proteína por SDS gel de poliacrilamida (12%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se bloqueó con 5% de leche en polvo no grasa en PBS que contiene 0,1% de Tween durante una hora. Las muestras se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario (anticuerpo 35 monoclonal DDAH II anti-ratón, originado contra los aminoácidos 241-25 –una secuencia única para el DDAH II humano; o anticuerpo políclonal PRMT-1 anti-conejo [Abcam plc, RU], 1:1000), antes del lavado y posterior incubación con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa anti-ratón o anti-conejo (DDAH II y PRMT-1, respectivamente) a una dilución de 1:3000. Las membranas se desarrollaron con sustrato de quimioluminiscencia potenciada plus (ECL plus, Amersham, UK). Las 40 transferencias se visualizaron y cuantificaron mediante el uso de herramientas Genesnap/Gene (Syngene, SLS, RU). Las membranas posteriormente se extrajeron a 55°C y se reanalizaron mediante el uso de un anticuerpo primario monoclonal anti humano de ratón de α-tubulina (Sigma-Aldrich, UK) seguido por anticuerpo secundario anti-ratón y desarrollado como antes, a fin de cuantificar la expresión de PRMT y DDAH por la corrección por el contenido de α-tubulina.

45 **Análisis estadístico:** Los datos se muestran como mediana [intervalo] o media ± error estándar de la media (SEM). Se usaron pruebas t no apareadas de dos colas para definir las diferencias entre las medias de los datos de la distribución normal de varianza igual, mediante el uso de un paquete disponible en el comercio (Graph Pad Prism, versión 4,0; Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para la evaluación estadística de los datos que no estaban distribuidos normalmente, se usó una prueba de Mann-Whitney (Graph Pad Prism). Los resultados se 50 consideraron significativos si P<0,05. La comparación entre múltiples grupos fue por análisis de varianza (ANOVA) con una corrección de Bonferroni para las comparaciones múltiples. El cálculo de las correlaciones entre las variables se realizó mediante el uso de un programa de ordenador de análisis de regresión; Excel 2003 (Microsoft Corporation, WA).

## 55 Resultados

**Pacientes:** De un número total de 64 pacientes evaluados durante un período de quince meses, se incluyeron 52 pacientes en el estudio, con una puntuación media de Pugh<sup>23</sup> para el grupo de  $10 \pm 0,3$  lo que refleja la cirrosis descompensada de esta cohorte. Este índice elevado de gravedad se complementó con una puntuación MELD elevada<sup>24</sup> y el gradiente de presión venosa hepática elevada (HVPG) de  $19 \pm 1$  mmHg para el grupo completo, lo que refleja hipertensión portal avanzada. Se excluyeron 12 pacientes: 7 con hepatitis viral concomitante, 3 con disfunción renal grave, 1 paciente sin evidencia histológica de cirrosis, y 1 paciente con sepsis fulminante. Mediante el uso de los criterios histológicos estándares definidos anteriormente<sup>18</sup> los 52 pacientes incluidos en el estudio posteriormente se dividieron en aquellos con cirrosis e inflamación como hepatitis alcohólica [AH+C+] (n=27), y aquellos con cirrosis alcohólica sola [AH- C+] (n=25), como se describe en la características del paciente de la tabla 1. La calificación de gravedad de la necroinflamación en las biopsias de

AH+C+ se realizó por la aplicación de un sistema de puntuación similar al sugerido para la esteatohepatitis no alcohólica,<sup>25</sup> y todos los pacientes incluidos presentaron una calificación moderada-grave acordada por 2 histopatólogos independientes.

5 Además de los criterios histológicos, todos los pacientes AH+C+ presentaron AH aguda grave evidenciada por una puntuación de la función discriminante (DF) de Maddrey de  $46 \pm 6$ ,<sup>26</sup> y reflejada en los niveles de bilirrubina plasmática y tiempos de protrombina significativamente elevados en comparación con los pacientes AH-C+, que se sintetizan en la Tabla 1. Las aminotransferasas séricas no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos ( $P=0,46$ ). Los niveles de creatinina sérica media estuvieron dentro del intervalo de referencia de laboratorio normal para ambos grupos, si bien el valor de creatinina medio fue superior en los pacientes AH+C+ en comparación con AH-C+,  $P=0,01$ . Veinte de los veintisiete pacientes AH+C+ tenían ascitis moderada a grave en comparación con diez de los veinticinco pacientes AH-C+;  $P=0,008$ . Veinte pacientes AH+C+ tenían encefalopatía hepática  $\geq$  grado 2 en comparación con cuatro de veinticinco pacientes AH-C+;  $P=0,02$ .

10 15 **Marcadores inflamatorios:** los pacientes AH+C+ tenían índices inflamatorios significativamente elevados en comparación con los pacientes AH-C+ evidenciado por CRP plasmático superior ( $P<0,001$ ), recuento de leucocitos elevado ( $P<0,001$ ), y puntuaciones del Síndrome Inflamatorio Sistémico (SIRS) ( $P<0,001$ ). La evidencia adicional de la inflamación en curso en los pacientes AH+C+ fue clara a partir de niveles plasmáticos significativamente superiores de TNF $\alpha$  ( $P<0,01$ ), TNF-R1 ( $P<0,01$ ) y TNF-R2 ( $P<0,001$ ), y niveles elevados de IL-6 ( $P<0,01$ ) en AH+C+, en comparación con pacientes AH-C+.

20 25 **HVPG:** los pacientes AH+C+ tenían HVPG media significativamente superior en comparación con los pacientes AH-C+ ( $22 \pm 1,9$  vs.  $15,5 \pm 1,6$  mmHg,  $P<0,01$ ), lo que refleja hipertensión portal más avanzada.

30 35 **Resultados de pacientes:** Hubo trece muertes de pacientes hospitalizados en los cincuenta y dos pacientes estudiados, doce con AH+C+ y uno entre los que tenían solo cirrosis. De las muertes AH+C+, ocho desarrollaron insuficiencia renal, cuatro de los cuales tenían sepsis concomitante y desarrollaron falla multiorgánica. Dos pacientes murieron de hemorragia GI descontrolada, mientras que otros dos pacientes no pudieron recuperarse de peritonitis bacteriana espontánea con organismos gram negativos, con desarrollo de una coagulopatía y falla multiorgánica. (Tabla 2). Entre los quince pacientes AH+C+ que sobrevivieron y fueron dados de alta con éxito del hospital dentro de 28 días, seis presentaron evidencia de infección durante su admisión, un paciente con insuficiencia renal respondió a la terapia de apoyo y dos tuvieron un episodio de hemorragia varicosa controlado. Los pacientes AH+C+ que murieron no presentaron diferencia significativa en la función discriminante ( $P=0,3$ ), puntuación de Pugh ( $P=0,2$ ) o puntuación MELD ( $P=0,6$ ) en comparación con los pacientes sobrevivientes AH+C+.

40 45 En el grupo de cirróticos solamente (AR- C+), un paciente hospitalizado murió de insuficiencia renal a pesar de la terapia de apoyo. De los 24 pacientes AH- C+ restantes, que fueron dados de alta exitosamente del hospital, cinco tuvieron un episodio de infección registrado durante su admisión, y hubo 1 hemorragia varicosa controlada. Los pacientes AH-C+ tuvieron puntuaciones de Pugh ( $P<0,001$ ) y puntuaciones de MELD ( $P<0,001$ ) significativamente menores que los sobrevivientes AH+C+ ( $n=15$ ).

50 55 **ADMA:** Los niveles plasmáticos promedio de ADMA fueron mayores en los 52 pacientes en comparación con 12 controles sanos [edad: 38 (31-55); 9 varones]:  $0,59 \pm 0,03$  versus  $0,37 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P<0,001$ . Además, los pacientes AH+C+ tuvieron valores de ADMA significativamente mayores en comparación con el grupo AH-C+:  $0,69 \pm 0,04$  versus  $0,49 \pm 0,02$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P<0,001$ , que se ilustra en la Figura 1a. Los niveles de ADMA en el tejido hepático fueron considerablemente mayores en los pacientes AH+C+ en comparación con AH- C+ ( $97 \pm 23$  versus  $27 \pm 13$   $\mu\text{mol/mg}$  de proteína,  $P<0,05$ ), y se demostró que se correlacionan con la presión portal,  $R=0,61$ ,  $P<0,05$ . Los niveles plasmáticos de ADMA fueron significativamente mayores en los pacientes que murieron durante su admisión ( $n=13$ ) en comparación con los sobrevivientes ( $n=39$ ) ( $0,77 \pm 0,08$  versus  $0,53 \pm 0,02$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P<0,001$ ); Figura 1b. Subanálisis adicionales revelaron niveles de ADMA significativamente mayores entre los pacientes AH+C+ dados de alta y los pacientes AH-C+ no inflamados ( $0,62 \pm 0,04$  versus  $0,49 \pm 0,02$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $P<0,01$ ). Además, los niveles de ADMA fueron superiores en los pacientes AH+C+ que murieron en comparación con los sobrevivientes AH+C+,  $P<0,05$ .

60 65 Figura 1c.

**SDMA:** El nivel plasmático medio de SDMA para los 52 pacientes aunque superior no fue estadísticamente significativo mayor que los controles:  $0,77 \pm 0,08$  versus  $0,46 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $P=0,08$ . Sin embargo, los niveles de SDMA fueron significativamente superiores en los pacientes AH+C+ en comparación con AH-C+ ( $1,03 \pm 0,1$  versus  $0,48 \pm 0,03$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P<0,001$ ). Los niveles de SDMA entre los pacientes AH+C+ fueron similares a los voluntarios sanos ( $P=0,67$ ) [Figura 2a] Los niveles de

5 SDMA fueron significativamente superiores en los pacientes que murieron durante la admisión en comparación con todos los sobrevivientes, ( $1,6 \pm 0,35$  versus  $0,6 \pm 0,05$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P<0,001$ ) [Figura 2b]. El subanálisis adicional de los pacientes AH+C+ demostró un SDMA significativamente superior en los pacientes que murieron en comparación con los sobrevivientes, en los que el DDMA medio fue  $0,8 \pm 0,1$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $P<0,05$  [Figura 2c]. También hubo, sin embargo, una diferencia significativa de SDMA entre los sobrevivientes AH+C+ y sobrevivientes AH-C+ inflamados en los que el nivel medio de SDMA fue  $0,48 \pm 0,03$ ;  $P<0,01$ .

10 **Factores pronóstico de supervivencia:** Las mediciones basales (día 0-3) de ADMA y SDMA, junto con MELD, puntuación de Pugh y Función Discriminante calculados en este punto de tiempo, se usaron para comparar la utilidad predictiva de estas mediciones para determinar la supervivencia de los pacientes hospitalizados, por el uso del área bajo de la curva (AUC) para las curvas de receptor-operador (ROC). El AUC para cada una de estas medidas predictivas para todos los pacientes, y un análisis separado para los pacientes AH+C+, se lista en la tabla 3. Además, cuando ADMA se comparó con SDMA en los pacientes AH+C+ como se muestra en la Figura 3, el valor límite para SDMA ( $<0,9$ ) derivado de su ROC, no abarcó todas las muertes predichas por el uso del valor límite de ADMA  $<0,65$ . En consecuencia, nosotros usamos una puntuación de dimetilarginina (DAS) combinada, calculada a partir de la suma de ADMA y SDMA [DAS= ADMA + SDMA], para probar y mejorar la utilidad predictiva de un nivel de dimetilarginina individual para determinar la supervivencia. El DAS calculado fue significativamente superior en los pacientes AH+C+ en comparación con AH- C+ ( $1,9 \pm 0,2$  versus  $0,96 \pm 0,04$ ;  $P<0,001$ ). Además, el valor de DAS fue significativamente superior en los pacientes AH+C+ no sobrevivientes en comparación con los sobrevivientes,  $2,5 \pm 0,38$  versus  $1,4 \pm 0,16$ ;  $P<0,01$ . En efecto, el valor de DAS mejoró la especificidad, mientras que mantiene una alta sensibilidad para predecir la evolución en todos los pacientes, y pareció al menos tan bueno para determinar la evolución como la puntuación de Pugh, DF o MELD, Tabla 3. Las mediciones de dimetilarginina repetidas de sangre tomada durante la admisión en los 12 pacientes AH+C+ que murieron en comparación con 18 sobrevivientes (6 AH- C+) en los que las muestras de sangre repetidas estuvieron disponibles, revelaron un porcentaje de aumento significativo del DAS en los pacientes que murieron en comparación con sobrevivientes ( $P<0,01$ ). Figura 4. Un gráfico de Kaplan-Meier para todos los pacientes estudiados se muestra en la Figura 5, y muestra la disminución significativa de la supervivencia en los pacientes con un valor de DAS de admisión  $> 1,23$ , con un rango logarítmico de  $P<0,001$ . Además, un valor límite de DAS de 1,52 pareció ser un factor pronóstico más útil que todos los otros sistemas de puntuación cuando se evalúa la supervivencia in pacientes AH+C+, como se muestra en la Figura 6.

35 **Expresión de DDAH II y PRMT-1:** La expresión de DDAH II hepática (corregida por una expresión de  $\alpha$ -tubulina) fue significativamente menor ( $P<0,01$ ) en los 4 pacientes AH+C+ en los que se midió, en comparación con 4 pacientes AH-C+. En contraste, la expresión de PRMT-1 estuvo significativamente aumentada en los hígados de pacientes AH+C+ ( $P<0,01$ ) como se muestra en la Figura 7. Los datos de PRMT-1 para 7 pacientes se muestran debido al homogenizado limitado extraído de 1 paciente AH-C+ para permitir adecuada carga de gel.

#### 40 Discusión

45 Los resultados de este estudio muestran que los pacientes con cirrosis alcohólica con inflamación superpuesta (AH+C+) comprobada histológicamente y con citoquinas proinflamatorias y componentes SIRS elevados, tienen gradientes de presión venosa hepática superiores en comparación con los pacientes con cirrosis solamente (AH- C+). Nosotros extendimos observaciones previas de ADMA circulante libre aumentado en cirrosis descompensada<sup>27</sup> con el nuevo hallazgo adicional de ADMA plasmático y en tejido hepático aumentados en los pacientes AH+C+ inflamatorios en comparación con AH- C+, y demuestran una asociación entre ADMA aumentado y presión portal elevada. Además, nuestros resultados demuestran niveles significativamente inferiores de ADMA y SDMA en sobrevivientes de cirrosis descompensada, con SDMA que también discrimina entre sobrevivientes y no sobrevivientes en el subgrupo de pacientes inflamatorios AH+C+, en los que la muerte se asocia principalmente con insuficiencia renal. Cuando los sistemas de puntuación validados actualmente (Child-Pugh, DF y MELD) usados para determinar la evolución temprana (mortalidad de pacientes hospitalizados) o necesidad de intervención en la hepatitis alcohólica se aplicaron a nuestra cohorte de pacientes, su utilidad predictiva fue limitada. Los niveles circulantes de ADMA, SDMA o la suma de estas dimetilargininas (DAS) predijeron que los pacientes estaban en riesgo de muerte. Nuestros resultados confirman informes previos de que los pacientes AH+C+ tienen niveles plasmáticos significativamente elevados de TNF $\alpha$ , TNF-RI y RII en comparación con los pacientes AH-C+<sup>21</sup>. Se considera que la inflamación, modulada mediante TNF $\alpha$ , es importante en la lesión hepática inducida por alcohol<sup>28,29</sup> y su inhibición en los modelos animales de lesión alcohólica, atenúa significativamente la inflamación hepática.<sup>30</sup> Además, los datos recientes del modelo animal también sugieren que la inflamación adicional puede ser importante en el aumento de la resistencia intrahepática en la cirrosis, lo que da origen a presión portal elevada.<sup>29</sup> En consecuencia, la presión

5 portal en los animales y seres humanos hipertensos portales se reduce con las intervenciones dirigidas a los mediadores de la inflamación tales como el tratamiento con talidomida<sup>31,32</sup>, y los anticuerpos monoclonales TNF $\alpha$ <sup>29</sup>. Nuestra reciente observación de una marcada reducción de la presión portal en los pacientes con cirrosis que tenían hepatitis alcohólica superpuesta, tratados con un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ , puede avalar la hipótesis de una relación entre inflamación y factores que modulan el tono intravascular.<sup>33</sup>

10 Existe un acuerdo general en la bibliografía de que el aumento de la resistencia intrahepática en cirrosis también tiene contribuciones de la disponibilidad de NO local reducida, secundaria a la actividad eNOS hepática reducida.<sup>5,6</sup> ADMA es un inhibidor de NOS endógeno, competitivo producido durante la proteólisis,<sup>11</sup> y se ha sugerido que el hígado es un sitio importante del metabolismo de ADMA.<sup>13</sup> Se ha demostrado que el ADMA elevado se asocia con disfunción endotelial en numerosas afecciones,<sup>34-36</sup> mientras que se ha descripto el aumento de excreción urinaria de ADMA en los pacientes con hepatitis activa crónica.<sup>37</sup> En forma reciente, se halló que ADMA es elevado en los cirróticos de fase terminal en comparación con los controles sanos<sup>27</sup> y en los pacientes con insuficiencia hepática antes del trasplante hepático ortóptico, los niveles caen significativamente, pos-trasplante.<sup>15</sup> Estos estudios implican que con la progresión de la enfermedad hepática y la hipertensión portal, aumenta el ADMA, y que después del trasplante hepático existe una declinación rápida, lo que sugiere una corrección de la alteración del metabolismo de ADMA asociado con una reducción de los índices inflamatorios, documentados pos-trasplante.<sup>38</sup> En este estudio, nosotros demostramos niveles de ADMA significativamente aumentados en plasma y tejido hepático en los pacientes AH+C+ con inflamación hepática superpuesta, en comparación con los pacientes AH-C+. Los efectos de la inflamación parecen ser superiores y más allá de los esperados para la cirrosis alcohólica sola<sup>14</sup>. Estos datos pueden avalar una hipótesis de que después de un aumento de los mediadores inflamatorios hepáticos, existe una alteración del metabolismo y/o generación de ADMA hepático.

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

La homeostasis del ADMA se mantiene por su metabolismo a través de la enzima DDAH, que es particularmente abundante en el hígado y el riñón.<sup>12,39</sup> Se ha mostrado que la actividad de DDAH se reduce por estímulos inflamatorios tales como TNF $\alpha$ .<sup>17</sup> En consecuencia cuando los niveles de TNF $\alpha$  están marcadamente aumentados, como se observa en los pacientes AH+C+, se podrían esperar niveles de ADMA hepático superiores a través del metabolismo alterado, y que esto a su vez disminuye la actividad de NOS hepática. Esta afirmación está avalada en parte por la observación del aumento de ADMA en tejido hepático acoplado con la reducción de la expresión de proteína de DDAH II hepática (el más abundante subtipo de DDAH hallado en el hígado) en los pacientes AH+C+ en este estudio, en los que HVPG estaba significativamente aumentado.

Una explicación alternativa para nuestra observación del aumento de ADMA en los pacientes AH+C+, es a través del aumento de la producción de ADMA. ADMA se genera por la acción de las PRMT, una familia de enzimas que metila la cadena lateral de nitrógeno de la arginina dentro de las proteínas.<sup>40</sup> Se han descripto varios tipos de PRMT, el Tipo I es el responsable de la generación de N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA) y ADMA, y el Tipo II, de L-NMMA y dimetilarginina simétrica (SDMA). Después de la proteólisis, que está aumentada en los estados hipermetabólicos tales como cirrosis e inflamación,<sup>41</sup> se generan cantidades significativas de ADMA<sup>42</sup>. La tasa de generación de ADMA y SDMA en consecuencia probablemente es dependiente de la presencia y actividad de PRMT y la tasa de degradación de la proteína. En conformidad con esto, nosotros observamos un aumento de la expresión de PRMT-1 en los pacientes AH+C+ en los que hay inflamación aumentada, en comparación con los pacientes AH-C+. Esta observación está avalada adicionalmente por los datos de los estudios sobre las células endoteliales humanas expuestas a LDL-colesterol oxidado, en los la liberación de ADMA regulada por aumento se asocia con aumento de la expresión de PRMT<sup>43</sup>.

Si bien nuestro estudio no estuvo impulsado ni destinado a investigar el papel de las dimetilargininas en la determinación de la supervivencia, uno de los hallazgos más importantes que surgen de este estudio fue la asociación de niveles de ADMA y SDMA elevados con mortalidad hospitalaria en el grupo entero de pacientes cirróticos alcohólicos (25%) y específicamente, en los pacientes AH+C+, en los que la mortalidad fue 44%, en conformidad con las series publicadas previas.<sup>44,45</sup> Los sistemas de puntuación actuales que predicen la evolución en la hepatitis alcohólica se centran en variables bioquímicas (bilirrubina, tiempo de protrombina y creatinina) y clínicas (grado de ascitis y encefalopatía) y no toman en cuenta específicamente los cambios significativos del estado proinflamatorio o cambios hemodinámicos marcados que se asocian con esta afección.<sup>26,46,47</sup>

En este estudio nosotros identificamos el uso potencial de niveles de dimetilarginina como marcadores biológicos medibles (con mínima variación inter-ensayo), que pueden predecir mortalidad hospitalaria temprana con una mejor sensibilidad (73%) y especificidad (83%) que las puntuaciones de pronóstico actuales. Nuestros datos también sugieren un aumento temporal adicional en los niveles de dimetilarginina en aquellos con mala evolución pero las conclusiones firmes sobre el valor discriminatorio de las mediciones repetidas son limitadas por el pequeño número de casos estudiados.

5 Es posible que los niveles de ADMA reflejen en parte el estado inflamatorio en la AH en los que se produce la disfunción vascular, que incluye dentro del lecho circulatorio renal<sup>48</sup>. El aumento del ADMA se ha asociado con una reducción del flujo plasmático renal efectivo y aumento de la resistencia renovascular,<sup>49</sup> que puede llevar al aumento de retención de SDMA. En efecto, SDMA ha demostrado recientemente que está elevado en los pacientes con síndrome hepatorrenal en comparación con los pacientes con cirrosis sin insuficiencia renal.<sup>50</sup> Una puntuación de dimetilarginina (DAS) combinada en consecuencia toma en consideración tanto la inflamación como la disfunción renal incipiente (las principales causas de mortalidad en nuestra cohorte de pacientes AH+C+) y puede explicar la mejor utilidad predictiva de este puntuación identificada en nuestro estudio.

10 En conclusión, nosotros observamos que los pacientes AH+C+ tienen una elevación más marcada del HVPG, que se asocia con un aumento del ADM en plasma y tejido hepático. El aumento de ADMA en los pacientes AH+C+ puede resultar de la disminución de la degradación (reducción de DDAH hepático) y/o aumento de producción (aumento de expresión de PRMT y/o proteólisis). Los niveles de dimetilarginina elevados pueden ser un marcador biológico importante de evolución nociva en la hepatitis alcohólica pero se requieren estudios adicionales en modelos apropiados para determinar si ADMA está involucrado en forma causal.

15

**Ejemplo 2: Los pacientes que mueren de enfermedad hepática alcohólica tienen una relación IMA:albúmina significativamente aumentada**

**Métodos**

20 **Método de evaluación para una relación de IMA:albúmina:** La prueba de púrpura de bromocresol Abbott AeroSet (BCP) se usa para la medición de albúmina sérica (Duly et al; J Clin Pathol 2003). La concentración de albúmina sérica modificada por la isquemia se puede determinar por la adición de una cantidad conocida de Co(II) a un espécimen de suero y la medición del Co(II) no unido por un ensayo colorimétrico mediante el uso de ditiotreitol (DTT) (Bhagavan, NV; Clin Chem 2003 y Bar-Or D; Eur J Biochem 2001). En consecuencia existe una relación inversa entre la cantidad de cobalto unido a albúmina y la intensidad de la formación de color. En breves palabras: Todas las reacciones se llevan a cabo en Eppendorf de 1,5 ml a temperatura ambiente. Se añaden 200 µl de suero de paciente a 50 µl de una solución de 1 g/L de cloruro de cobalto, seguido por mezclado vigoroso, y una incubación de 10 minutos. Posteriormente se añadió DTT (50 µl de una solución de 1,5 g/L) y se mezcló. Después de una incubación de 2 minutos, se añadió 1,0 ml de una solución de 9,0 g/L de NaCl. La absorbancia de las mezclas de ensayo se lee a 470 nm con un espectrofotómetro de matriz de diodo Hewlett Packard 8452A. Se prepara una muestra de referencia de modo similar con la exclusión de DTT. Todas las sustancias químicas, que incluyen cloruro de cobalto y DTT, adquirido en Sigma-Aldrich.

35 **Resultados**

40 **Desarrollo de un nuevo biomarcador: "DASIMAR":** Debido a los niveles variados de albúmina hepática de los pacientes, determinados en parte por la nutrición y en gran parte por la función de síntesis hepática residual, nosotros hemos modificado la aplicación del ensayo de unión de albúmina a cobalto para tomar en consideración una relación de IMA a albúmina nativa en el suero – una relación IMA:albúmina en suero, o "IMAR". Los datos de una serie de 52 pacientes con enfermedad hepática alcohólica descompensada sugieren que los pacientes que mueren tienen una relación significativamente aumentada de IMA:albúmina ( $P<0,01$ ). Además, al igual que con el valor de DAS, existe una indicación de que IMAR pueden reflejar el estado inflamatorio y por ende la evolución patológica subyacente de la enfermedad. Mediante el uso de las curvas de receptor-operador para predecir mortalidad, se halló que el área bajo la curva es 0,73 ( $\pm 0,06$ ) para la cohorte estudiada, lo que sugiere que IMAR puede ser una prueba predictiva útil de mortalidad en estos pacientes.

**Discusión**

50 A pesar de que DAS y IMAR son indicativos de marcadores para la progresión y evolución de la enfermedad, nosotros hallamos que la combinación de una Puntuación de Dimetilarginina (DAS - ver Ejemplo 1) con IMAR como un biomarcador combinado, mejoró la utilidad predictiva de mala evolución, con un AUROC de 0,91 ( $\pm 0,04$ ) con intervalos de confianza de 95% de 0,81-0,99, y una sensibilidad de 74% y especificidad de 92%. Esto proporciona un excelente utilidad predictiva para evaluar el riesgo de mortalidad. (Figuras 9 y 10), mientras que también refleja el empeoramiento de la falla orgánica e inflamación, los elementos de la fisiopatología de insuficiencia hepática, que pueden ser dirigidos con intervenciones específicas tales como diálisis de albúmina y terapias para reducir la inflamación. En consecuencia DASIMAR también se usa potencialmente para controlar la respuesta a la intervención.

**Ejemplo 3: IMAR, DAS y DASIMAR para predecir la supervivencia en un modelo de insuficiencia hepática en roedores**

5 Las ratas se trataron con un agente conocido por causar lesión hepática, galactosamina (Sigma, Poole UK), por inyección intraperitoneal (IP) a razón de 1 g/kg (n=22) seguido 24 horas más tarde por un estímulo adicional en un subgrupo con lipopolisacárido (LPS - *Klebsiella pneumonia*, n=11) para estimular infección/inflamación adicional administrado en forma IP a razón de 1 mg/kg. Las muestras de sangre posteriormente se obtuvieron inmediatamente antes de la muerte.

10 Los animales que reciben el estímulo a las 24 horas murieron en 6 horas, en comparación con las ratas que reciben galactosamina sola o animales simulados que recibieron una dosis similares de LPS.

15 Las mediciones de ADMA, SDMA, e IMAR se tomaron mediante el uso de los mismos métodos descriptos en los Ejemplos previos. Como en los datos de los pacientes humanos, se observó que DASIMAR es un factor pronóstico de mortalidad mucho mejor (AUROC de 0,96) que DAS o IMAR solo (véase la Figura 11). En efecto, en este modelo, DASIMAR tiene una alta sensibilidad (96%) y especificidad (91%) para predecir evolución, lo que destaca el efecto de la combinación de los componentes DAS y IMAR y pone énfasis en la utilidad de esta puntuación en modelos diferentes de enfermedad hepática y en el contexto de sepsis.

	AUROC	Error estándar de la media	Sensibilidad %	Especificidad %
<b>DASIMAR</b>	0,96	0,03	96	91
<b>DAS</b>	0,92	0,05	89	82
<b>IMAR</b>	0,82	0,07	73	91

20 **Tabla 1: Características basales para todos los pacientes estudiados y su subclasificación en pacientes con hepatitis alcohólica (AH+C+) y cirrosis sin inflamación (AH-C+)**

	Pacientes totales (n= 52)	Hepatitis alcohólica (AH+C+, n=27)	Solo cirrosis (AH-C+, n=25)
Edad (años)	50 [32-69]	47 [32-69] ns	51 [38-67]
Bilirrubina (μmol/L) [3-17]	169 ± 26	291 ± 38 ***	56 ± 13
Protrombina (seg) [10-12]	15,6 ± 0,7	18 ± 1 **	13,4 ± 0,6
ALT (U/L) [8-50]	55 ± 9	60 ± 15 ns	47 ± 9
Creatinina (μmol/L) [66-112]	76,5 ± 9,7	92,5 ± 11 *	59,8 ± 5
Puntuación de Pugh	10±0,3	11,5±0,3 ***	8,4±0,4
Puntuación de MELD	7,4 ± 1,7	15 ± 2,3 ***	0,26 ± 1,4
HVPG (mmHg) [<5 ]	19 ± 1	22 ± 1,9 **	15,5 ± 1,6
CRP (mg/L) [0-5]	33,5±6,5	50+7 ***	17+3 .
WBC (x10 <sup>9</sup> /L) [3-10]	10,2 ± 1,4	14,3 ± 1,6 ***	-6,4 ± 0.

SIRS [0]	0,9±0,2	1,6±0,4	***	0,3±0,1
TNF $\alpha$ (pg/ml) [0-5]	21 ± 11	46 ± 20	**	4 ± 0,5
TNFR1 (ng/ml) [0-1,6]	726 ± 76	885 ± 93	**	455 ± 74
TNFR2 (ng/ml) [0-3,5]	1237 ± 141	1798 ± 128	***	759 ± 136
IL-6 (pg/ml) [0-5]	29,5 ± 9,6	55,7 ± 19	*	9,3 ± 2

**Tabla 2: Características de evolución entre los pacientes estudiados**

	Muertes por hepatitis alcohólica (n=12)	Altas de hepatitis alcohólica (n=15)	Altas de solo cirrosis (n=24)
Insuficiencia renal	8	1	0
Hemorragia gastrointestinal	2	2	1
Infección	6 (2 con SBP)	6	5
Puntuación de Pugh	$11,9 \pm 0,5$	$11,1 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,4$ ***
MELD	$16,2 \pm 3,9$	$14,2 \pm 3,1$	$0,7 \pm 1,7$ ***
Función discriminante	$53 \pm 13$	$41 \pm 6$	-

\*\*\* P<0,001: Cirrosis alcohólica comparada con pacientes de hepatitis alcohólica dados de alta del hospital

Tabla 3: Comparación de puntuaciones pronósticas con los niveles de dimetilarginina para predecir evolución en todos los pacientes con cirrosis alcohólica estudiados y en un subgrupo con hepatitis alcohólica mediante el uso de curvas receptor-operador

Sistema de puntuación/ nivel de dimetilarginina	Valor límite (%Sensibilidad; Especificidad)	AU ROC	Valor límite (%Sensibilidad; Especificidad)	AU ROC
Pugh	10,5 (63; 75)	0,81 ± 0,07	11,5 (60;64)	0,65 ± 0,11
DF	36 (76; 73)	0,78 ± 0,08	39 (53;70)	0,55 ± 0,13
MELD	10,3 (74; 73)	0,76 ± 0,08	18,9 (60;40)	0,53 ± 0,12
ADMA	0,57 (74; 77)	0,83 ± 0,06	0,65 (73; 75)	0,74 ± 0,09
SDMA -	0,7 (77; 85)	0,87 ± 0,06	0,89 (73;67)	0,82 ± 0,08
DAS	1,23 (77; 92)	0,9 ± 0,05	1,5 (73;83)	0,85 ± 0,07

## Pacientes totales      Hepatitis alcohólica

5 (AH+C+)

DAS (Puntuación de dimetilarginina) = Suma de ADMA y SDMA

AUROC (área bajo la curva)  $\pm$  SEM

La Sensibilidad y Especificidad, respectivamente, en cada valor límite se especifica entre paréntesis.

10

**Referencias**

1. Tome S, Lucey MR. Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:707-14.
2. Duvoux C, Radier C, Roudot-Thoraval F, Maille F, Anglade MC, Van Nhieu JT, Rosa I, Hospitel S, Abd-Alsamad I, Sitruk V, Seror O, Zioli M, Blondon H, Dhumeaux D, Richardet JP. Low-grade steatosis and major changes in portal flow as new prognostic factors in steroid-treated alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2004;40:1370-8.
3. Ripoll C, Banares R, Rincon D, Catalina MV, Lo Iacono O, Salcedo M, Clemente G, Nunez O, Matilla A, Molinero LM. Influence of hepatic venous pressure gradient on the prediction of survival of patients with cirrhosis in the MELD Era. *Hepatology* 2005;42:793-801.
4. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478-91.
5. Gupta TIC, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926-31.
6. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-51.
7. Fiorucci S, Antonelli E, Brancalene V, Sanpaolo L, Orlandi S, Distrutti E, Acuto G, Clerici C, Baldoni M, Del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. *J Hepatol* 2003;39:932-9.
8. Van De Casteele M, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, Fevery J. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002;51:440-445.
9. Shah V, Chen AF, Cao S, Hendrickson H, Weiler D, Smith L, Yao J, Katusic ZS. Gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to liver in vivo and in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G1023-30.
10. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martn P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Sessa WC, Jimenez W. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003;125:522-31.
11. Leiper J, Valiance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999;43:542-8.
12. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Valiance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996;119:1533-40.
13. Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MP, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clin Nutr* 2003;22:17-22.
14. Lluch P, Torondel B, Medina P, Segarra G, Del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM. Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2004;41:55-9.
15. Siroen MP, Warle MC, Teerlink T, Nijveldt RJ, Kuipers EJ, Metselaar HJ, Tilanus HW, Kuik DJ, van der Sijp JR, Meijer S, van der Hoven B, van Leeuwen PA. The transplanted liver graft is capable of clearing asymmetric dimethylarginine. *Liver Transpl* 2004;10:1524-30;
16. Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 2003;22:23-30.
17. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99:3092-5.
18. MacSween RN, Burt AD. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1986;6:221-32.
19. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ

- failure. *Chest* 1992;101:1481-3.
20. Owen LJ, Wear JE, Keevil BG. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for serum creatinine and comparison with enzymatic and Jaffe methods. *Ann Clin Biochem* 2006;43:118-23.
  - 5 21. Tilg H, Jalan R, Kaser A, Davies NA, Offner FA, Hodges SJ, Ludwiczek O, Shawcross D, Zoller H, Alisa A, Mookerjee RP, Graziadei I, Datz C, Trauner M, Schuppan D, Obriest P, Vogel W, Williams R. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2003;38:419-25.
  - 10 22. Gornall AG. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem* 1949;177:751-766.
  23. Infante-Rivard C, Esnaola S, Villeneuve JP. Clinical and statistical validity of conventional prognostic factors in predicting short-term survival among cirrhotics. *Hepatology* 1987;7:660-4.
  - 15 24. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464-70.
  - 25 25. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
  - 20 26. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, Weber FL, Jr., Mezey E, White RI, Jr. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:193-9.
  27. Tsikas D, Rode I, Becker T, Nashan B, Klempnauer J, Frolich JC. Elevated plasma and urine levels of ADMA and 15(S)-8-iso-PGF2alpha in end-stage liver disease. *Hepatology* 2003;38:1063-4.
  - 25 28. Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 1991;13:267-76.
  29. Lopez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995;108:761-7.
  - 30 30. Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 1997;26:1530-7.
  - 35 31. Austin AS, Mahida YR, Clarke D, Ryder SD, Freeman JG. A pilot study to investigate the use of oxpentifyline (pentoxifyline) and thalidomide in portal hypertension secondary to alcoholic cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:79-88.
  32. Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1996;23:1616-21.
  - 40 33. Mookerjee RP, Sen S, Davies NA, Hodges S, Williams R, Jalan R. TNF is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis. *Gut* 2003;52:1182-87.
  34. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Valiance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455-9.
  - 45 35. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanova I, Fermo I, Frolich J, Boger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-7.
  36. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003;361:1511-7.
  - 50 37. Carnegie PR, Fellows FC, Symington GR. Urinary excretion of methylarginine in human disease. *Metabolism* 1977;26:531-7.

38. Jalan R, Pollok A, Shah SH, Madhavan K, Simpson KJ. Liver derived pro-inflammatory cytokines may be important in producing intracranial hypertension in acute liver failure. *J Hepatol* 2002;37:536-8.
- 5 39. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *10 Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:671-7.
40. McBride AE, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001;106:5-8.
- 10 41. Marliss EB, Chevalier S, Gougeon R, Morais JA, Lamarche M, Adegoke OA, Wu G. Elevations of plasma methylarginines in obesity and ageing are related to insulin sensitivity and rates of protein turnover. *Diabetologia* 2006;49:351-9.
42. Inoue R, Miyake M, Kanazawa A, Sato M, Kalcimoto Y. Decrease of 3-methylhistidine and increase of NG,NG-dimethylarginine in the urine of patients with muscular dystrophy. *Metabolism* 1979;28:801-4.
- 15 43. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000;87:99-105.
44. Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxyfylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:1637-48.
- 20 45. Carithers RL, Jr., Herlong HF, Diehl AM, Shaw EW, Combes B, Fallon HJ, Maddrey WC. Methylprednisolone therapy in patients with severe alcoholic hepatitis. A randomized multicenter trial. *Ann Intern Med* 1989;110:685-90.
46. Forrest EH, Evans CD, Stewart S, Phillips M, Oo YH, McAvoy NC, Fisher NC, Singhal S, Brind A, Haydon G, O'Grady J, Day CP, Hayes PC, Murray LS, Morris AJ. Analysis of factors predictive of mortality in alcoholic hepatitis and derivation and validation of the Glasgow alcoholic hepatitis score. *Gut* 2005;54:1174-9.
- 25 47. Dunn W, Jamil LH, Brown LS, Wiesner RH, Kim WR, Merlon KV, Malinchoc M, Kamath PS, Shah V. MELD accurately predicts mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2005;41:353-8.
48. Mookerjee RP DN, Hodges SJ, Dalton RN, Williams R, Jalan R. Hepatic inflammation increases portal pressure through inhibition of eNOS activity - potential mechanisms. *Gut* 2006;Abstract.
- 30 49. Kielstein JT, Tsikas D, Fliser D. Effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) infusion in humans. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62 Suppl 13:39-44.
50. Lluch P, Mauricio MD, Vila JM, Segarra G, Medina P, Del Olrno JA, Rodrigo JM, Serra MA. Accumulation of symmetric dimethylarginine in hepatorenal syndrome. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;23 1:70-5.

## REIVINDICACIONES

- 5        1.        Un método para evaluar la función hepática en un individuo, tal método comprende determinar (a) el nivel combinado de dimetilarginina asimétrica (ADMA) y dimetilarginina simétrica (SDMA), y (b) la relación de albúmina modificada por isquemia (IMA): albúmina (IMAR) en el individuo y donde el método se lleva a cabo en una muestra del individuo, de este modo se evalúa la función hepática en el individuo.
- 10      2.        Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el método es para controlar la progresión de la enfermedad hepática en el individuo, lo que predecir la evolución de la enfermedad hepática en el individuo, evaluar la función hepática en postrasplante hepático, evaluar la función hepática en la lesión de reperfusión en un injerto postrasplante hepático o evaluar la función hepática en pacientes que desarrollan falla multiorgánica y/o sepsis.
- 15      3.        Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el individuo sufre de insuficiencia hepática.
- 15      4.        Un método de acuerdo con la reivindicación 3, donde el individuo sufre de insuficiencia hepática crónica, insuficiencia hepática crónica en fase aguda o insuficiencia hepática aguda.
- 20      5.        Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el individuo sufre de enfermedad hepática alcohólica.
- 20      6.        Un método de acuerdo con la reivindicación 5, donde el individuo sufre de cirrosis o cirrosis y/o hepatitis alcohólica.
- 25      7.        Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde un aumento en el nivel combinado de ADMA y SDMA, en comparación con el nivel combinado de ADMA y SDMA en un individuo que no sufre de la enfermedad hepática o en un individuo que es un sobreviviente de la enfermedad hepática, es indicador de un aumento de riesgo de mortalidad en el individuo.
- 30      8.        Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un aumento en IMAR, en comparación con IMAR en un individuo que no sufre de la enfermedad hepática o en un individuo que es un sobreviviente de la enfermedad hepática, es indicativo de un aumento de riesgo de mortalidad en el individuo.
- 35      9.        Un método de acuerdo con las reivindicaciones 7 o 8, en el que un aumento en el nivel combinado de ADMA y SDMA y un aumento en IMAR, en comparación con un individuo que no sufre de la enfermedad hepática o en un individuo que es un sobreviviente de la enfermedad hepática, es indicativo de un aumento de riesgo de mortalidad en el individuo.
- 35      10.      Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se determinan puntuaciones adicionales del pronóstico de la enfermedad hepática.
- 40      11.      Un método de acuerdo con la reivindicación 10, donde una o más puntuaciones adicionales del pronóstico de la enfermedad hepática es uno o más del sistema de puntuación de Child-Pugh, Criterios de West Haven, Escala de Coma de Glasgow, sistema de puntuación de Child-Pugh modificado, SOFA, MELD o APACHE II.
- 40      12.      Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la muestra es una muestra de plasma o una muestra de tejido hepático.

Figura 1

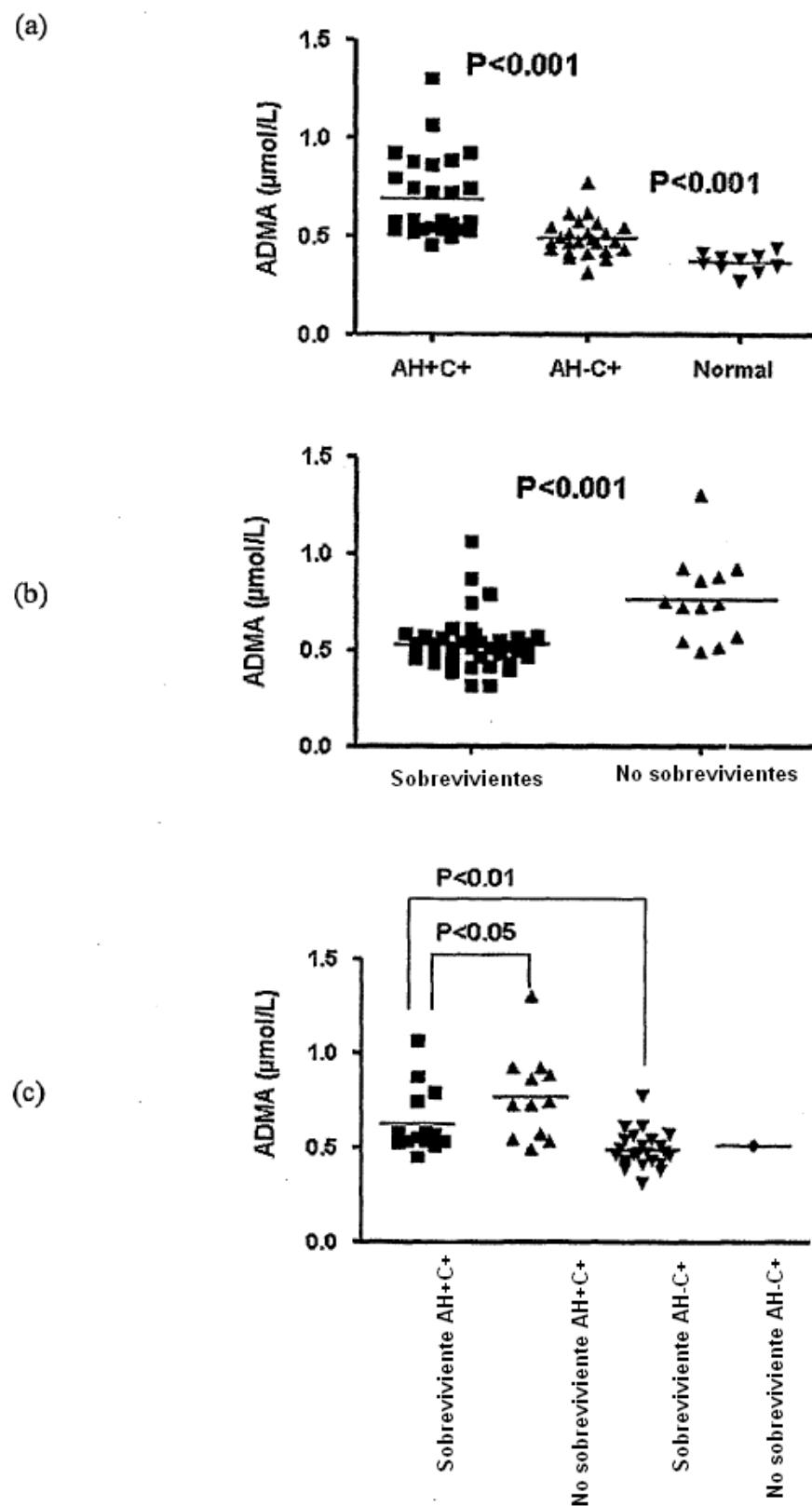
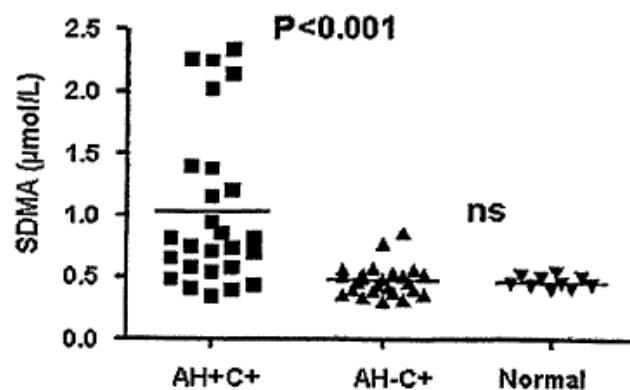
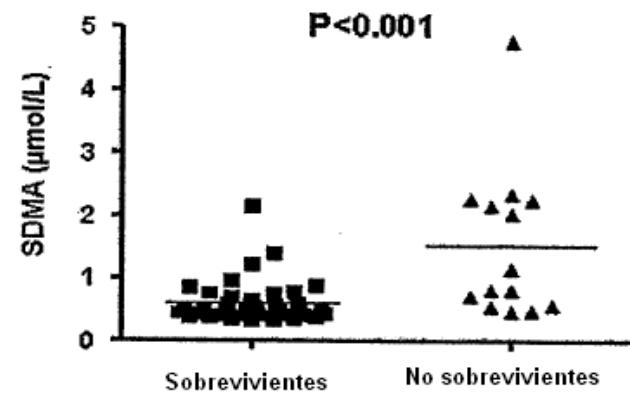


Figura 2

(a)



(b)



(c)

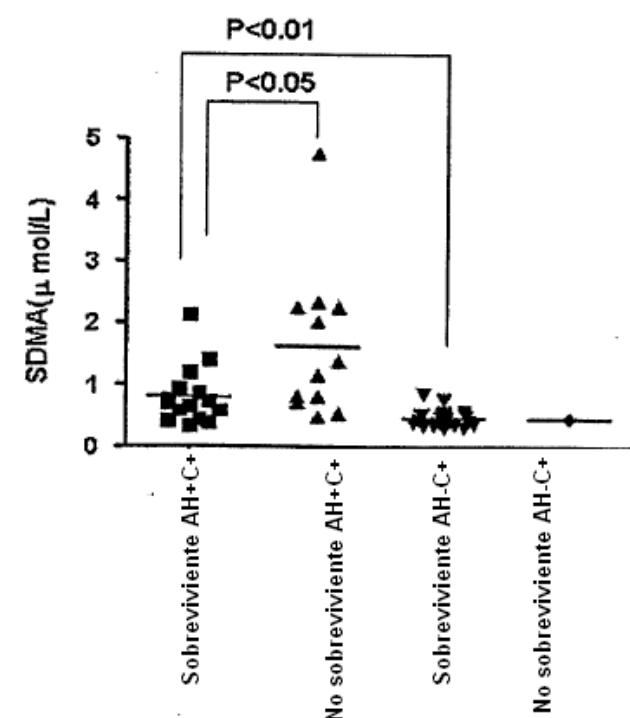


Figura 3

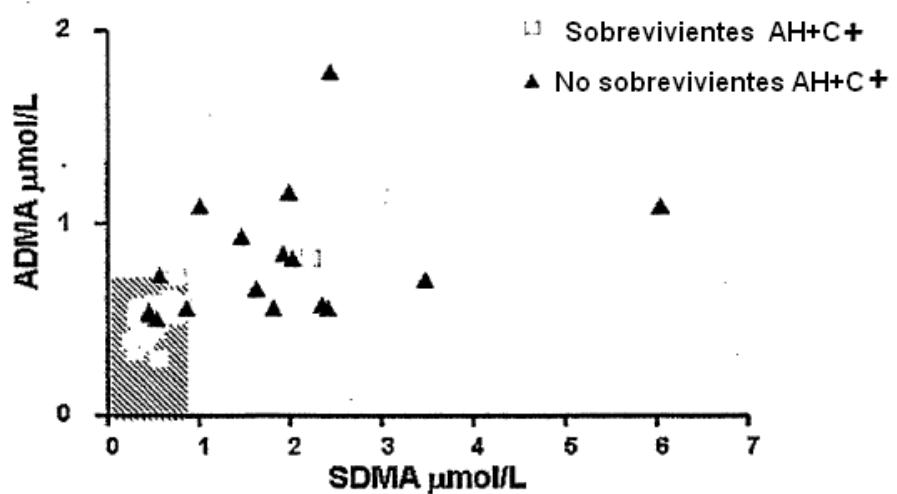


Figura 4

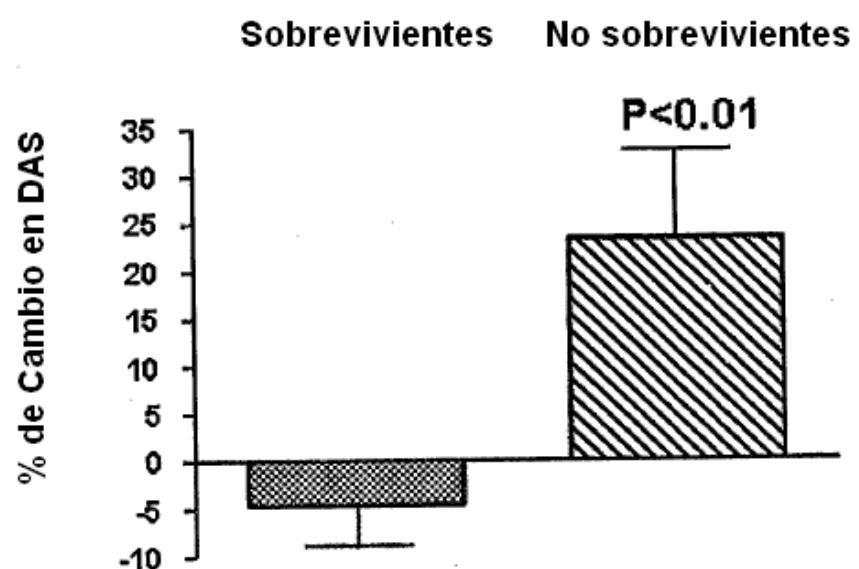


Figura 5

## Análisis de Kaplan Meier para todos los pacientes cirróticos

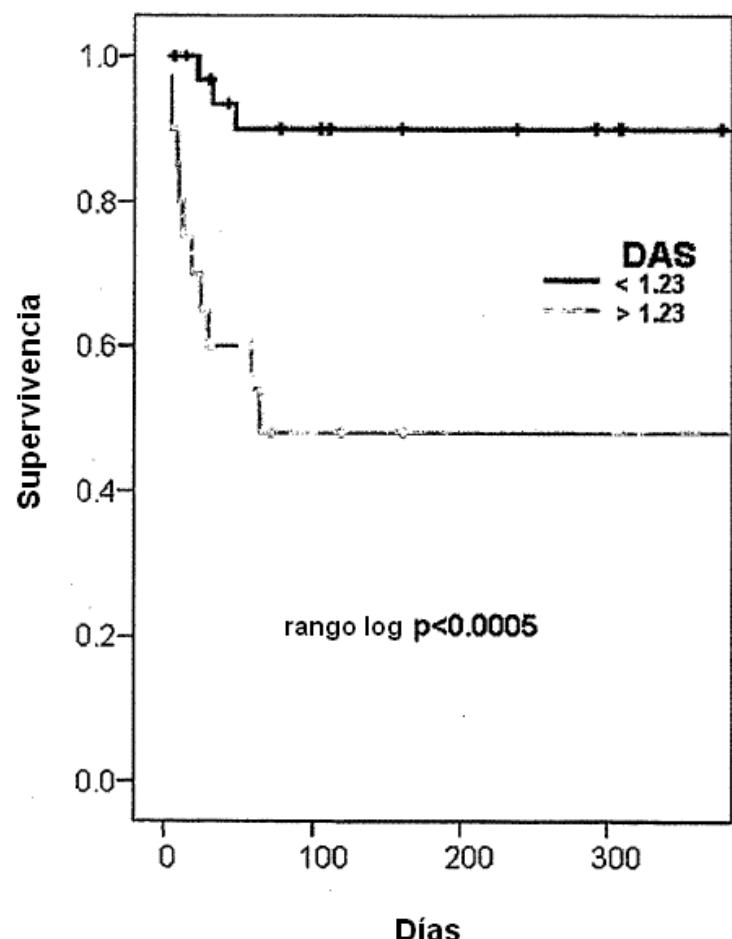


Figura 6

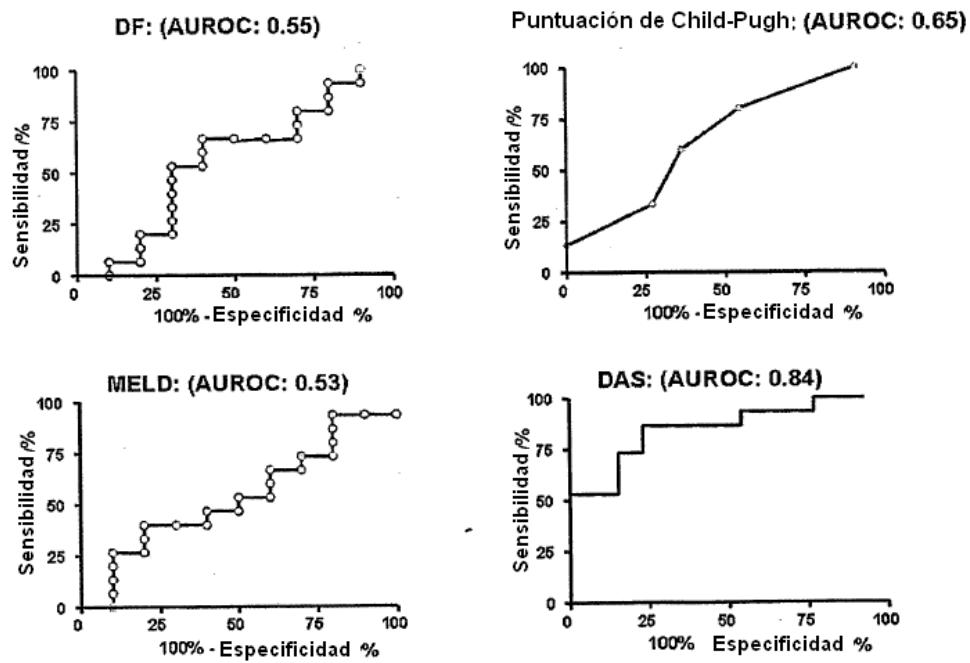


Figura 7

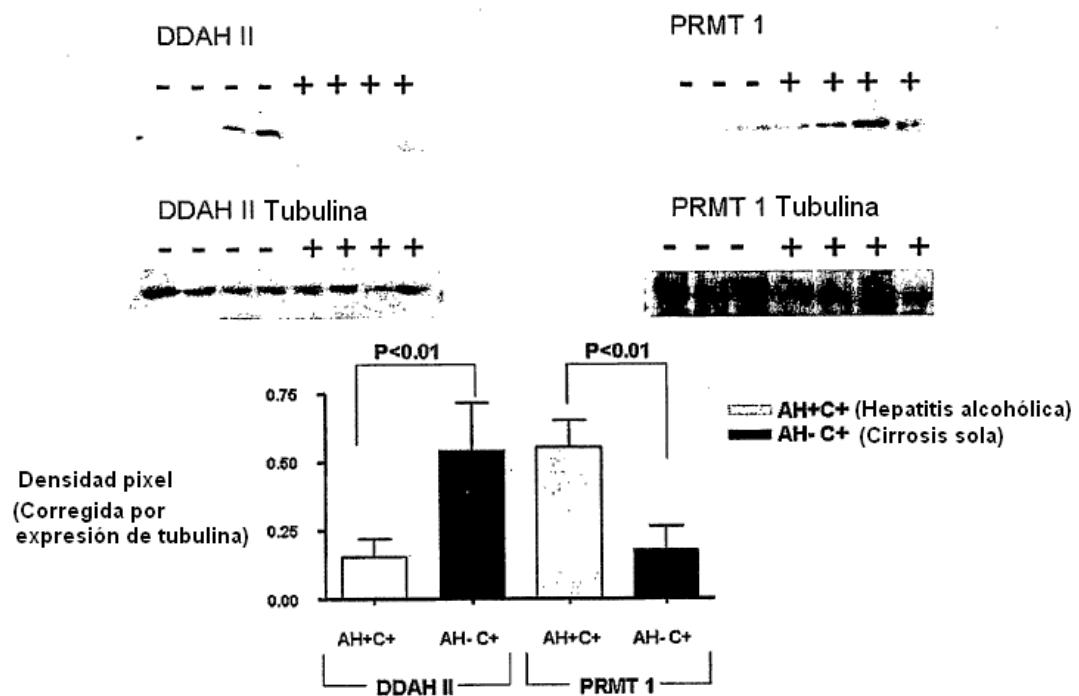


Figura 8

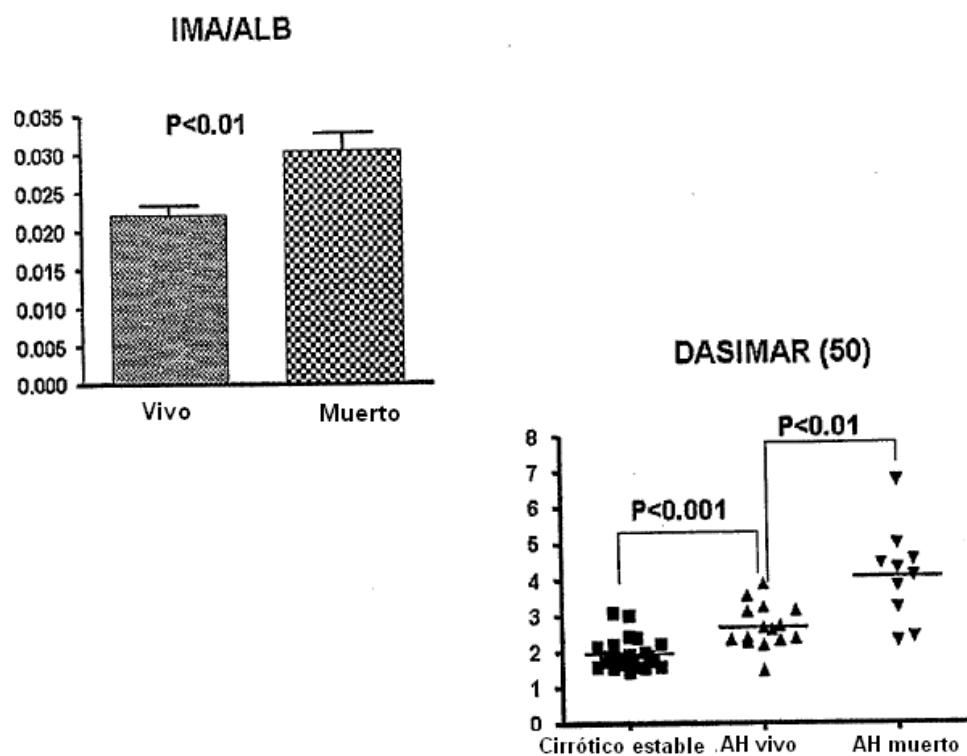


Figura 9

**IMAR**  
AUROC: 0.73 ( $\pm 0.06$ )

**DASIMAR**  
AUROC: 0.91 ( $\pm 0.04$ )

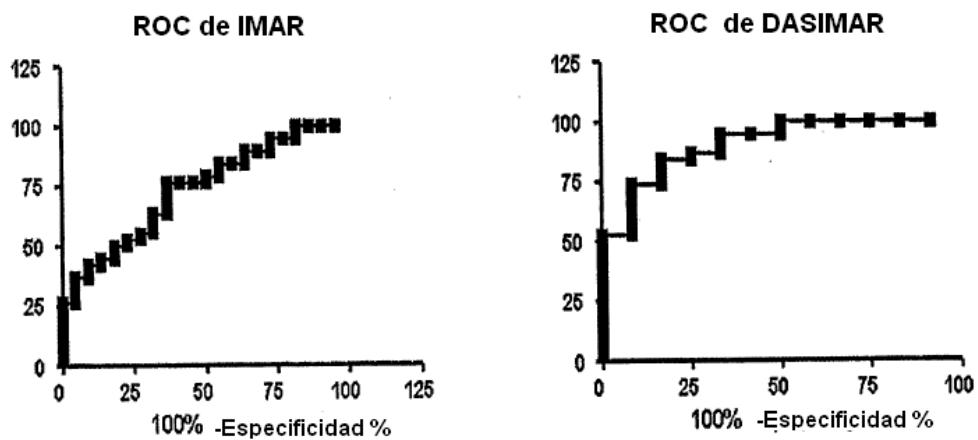


Figura 10

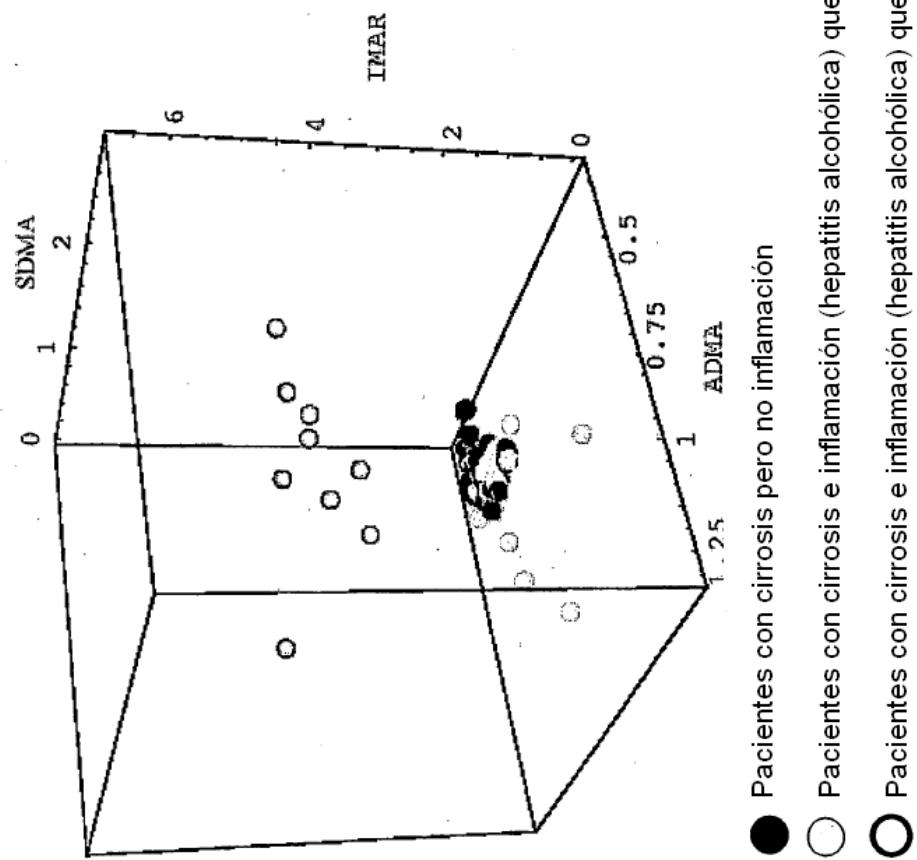


Figura 11

