

Grau en Estadística

Títol: Anàlisi de l'expressió inflamatòria i la supervivència dels pacients cirròtics

Autora: Carla Pitarch Abaigar

Directors: Àlex Amorós, Guadalupe Gómez i Àlex Sànchez

Departament: Estadística

Convocatòria: Juny de 2018



AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull agrair a totes aquelles persones que han col·laborat en la realització d'aquest projecte i m'han permès adquirir grans capacitats i coneixements.

M'agradaria començar agraint el paper imprescindible de l'Àlex Amorós, la Guadalupe Gómez i l'Àlex Sánchez com a directors d'aquest projecte. Per la seva paciència, confiança, orientació, disposició, implicació i recolzament durant el desenvolupament d'aquest treball.

Per altra banda, vull donar les gràcies als companys de la EF-CLIF pels seus ànims i la seva col·laboració. I al Jonel, perquè sense la seva dedicació aquest projecte no hagués estat possible.

A nivell personal, vull agrair als meus pares tot el suport que m'han donat durant aquests quatre anys. Sense la seva ajuda i la seva confiança no hauria arribat fins aquí. Gràcies pel vostre recolzament, amor i dedicació. També vull donar les gràcies al Roger, per la seva gran ajuda en la realització d'aquest projecte tant a nivell personal com a nivell acadèmic. Per deixar-me aprendre tant de tu, per la teva interminable paciència, confiança i suport incondicional.

Per últim, als meus amics, per estar sempre disposats a treure'm un somriure. Als companys que he conegut durant el grau, amb els quals he pogut compartir innumerables experiències i que tanquem junts aquest període sent grans amics.

Sense la vostra ajuda aquest projecte no hauria estat possible.

RESUM

La cirrosi hepàtica es pot presentar de forma compensada o descompensada, caracteritzant-se aquesta última per l'aparició d'alguna complicació com ascites, encefalopatia hepàtica, hemorràgia gastrointestinal i/o infecció bacteriana. En cirrosi descompensada, és freqüent el desenvolupament de la síndrome *Acute-on-Chronic Liver Failure* (ACLF), definida per la presència d'insuficiències i disfuncions orgàniques i una elevada taxa de mortalitat a curt termini. Recentment, s'ha trobat que el desenvolupament del mecanisme d'inflamació sistèmica té un rol rellevant en els pacients que pateixen ACLF. L'objectiu de la present investigació, és estudiar el patró d'expressió inflamatòria dels pacients cirròtics en funció de la presència de possibles complicacions orgàniques, així com la mortalitat, considerant la mort com a esdeveniment principal i el trasplantament de fetge com a esdeveniment competitiu.

Paraules clau: Cirrosi, Compensada, Descompensada, *Acute-on-Chronic Liver Failure*, Mortalitat, Insuficiència Orgànica, Disfunció Orgànica, Inflamació Sistèmica, Trasplantament de Fetge

Classificació AMS: 62-09 Graphical Methods, 62-N01 Censored Data Models, 62P10 Applications to biology and medical sciences, 92B15 General biostatistics.

Analysis of inflammatory expression and survival of cirrhotic patients

ABSTRACT

Liver cirrhosis is a degenerative disease caused by the deterioration of healthy liver tissue and may be either compensated or decompensated, characterized the latter by the development of large ascites, hepatic encephalopathy, gastrointestinal hemorrhage, bacterial infection, or any combination of them. In the context of decompensated cirrhosis, the development of the syndrome known as Acute-on-Chronic Liver Failure (ACLF) is common. The syndrome is defined by the presence of organ dysfunctions and organ failures and high short-term mortality. Patients with decompensated cirrhosis without ACLF may have a single liver failure, while ACLF is defined by the occurrence of a single renal failure, single non-renal failure (liver, coagulation, circulation, respiration) associated with organ dysfunction (renal/cerebral) or patients with more than one failure. Recently, it has been found that the development of the systemic inflammation mechanism has a relevant role in ACLF patients. The first aim of the present investigation is to study the inflammatory expression pattern in a sample of 582 healthy, compensated, decompensated and ACLF patients, depending on the presence of possible organ complications. Commonly, cirrhotic patients need to receive a liver transplant which modifies their probability of dying. Because of this, the second objective of this project is to assess their mortality considering death as a primary event and liver transplant as a competitive event and quantify the risk of death of decompensated and ACLF patients according to the development of organ dysfunctions and organ failures. The results show a clear association between worsening hepatic cirrhosis, along with the manifestation of organic complications, and accentuation of inflammation. Moreover, there is evidence that ACLF patients have a higher risk of dying than the decompensated individuals without ACLF, being the probability of dying from the two groups of 37% and 16%, respectively. In addition, there is no certainty that the development of organ dysfunction or organ failure in decompensated cirrhotic patients leads to an increase in the risk of death.

Keywords: Cirrhosis, Compensated, Decompensated, Acute-on-Chronic Liver Failure, Mortality, Systemic Inflammation, Organ Dysfunction, Organ Failure, Liver Transplant, Risk

ÍNDIX

I.	INTRODUCCIÓ	13
1.	Nocions teòriques	13
2.	Antecedents.....	16
3.	Motivació	17
4.	Objectius.....	18
II.	ESTUDI CANONIC.....	19
1.	Pacients i variables	20
2.	Descriptiva de les dades	22
i.	Transformacions de les dades	28
III.	ANÀLISI DELS MARCADORS D'INFLAMACIÓ	31
1.	Metodologia	31
2.	Software	32
3.	Resultats.....	33
i.	Anàlisi dels marcadors segons el grup de pacient	33
ii.	Anàlisi dels marcadors segons la presència de complicacions orgàniques.....	35
iii.	Anàlisi dels marcadors segons tipus de complicacions orgàniques	36
iv.	Anàlisi de l'agrupació natural dels pacients.....	38
4.	Conclusions	41
IV.	ANÀLISI DE SUPERVIVÈNCIA.....	42
1.	Metodologia	42
2.	Software	47
3.	Resultats.....	47
i.	Anàlisi de la mortalitat segons el grup de pacient	48
ii.	Anàlisi de la mortalitat segons la presència de complicacions orgàniques.....	50
iii.	Anàlisi de la mortalitat segons tipus de complicacions orgàniques	53

iv. Anàlisi de la mortalitat segons la resposta inflamatòria	56
4. Conclusions	59
V. DISCUSSIÓ	61
VI. REFERÈNCIES	63
VII. ANNEXOS	65
1. Annex 1: Normalitat de les variables	65
2. Annex 2: Taules descriptives	66
3. Annex 3: Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació.....	70
4. Annex 4: Anàlisi dels marcadors d'inflamació	72
5. Annex 5: Correlacions entre marcadors d'inflamació	74

ÍNDIX DE TAULES

Taula I.1. CLIF-Organ Failure Score.....	13
Taula I.2. Child-Pugh Score	15
Taula II.1. Nivells de detecció dels marcadors d'inflamació	21
Taula II.2. Descriptiva de les característiques generals segons el grup de pacient.....	23
Taula II.3. Descriptiva dels nivells dels marcadors d'inflamació segons el grup de pacient ..	24
Taula II.4. Descriptiva de les característiques generals segons la mortalitat per un temps de seguiment de 90 dies	26
Taula II.5. Descriptiva dels nivells dels marcadors d'inflamació segons la mortalitat per un temps de seguiment de 90 dies	27
Taula III.1. Comparació de l'agrupació dels pacients predefinida i l'agrupació natural.....	39
Taula IV.1. Freqüències absolutes i relatives en funció de l'estat i el grup de pacient	48
Taula IV.2. Probabilitats de morir en funció del grup de pacient	49
Taula IV.3. Resultats del model de regressió de Cox i el model de Fine i Gray en funció del grup de pacient	49
Taula IV.4. Freqüències absolutes i relatives en funció de l'estat i la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF.....	51
Taula IV.5. Probabilitats de morir en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada en comparació amb ACLF.....	52
Taula IV.6. Resultats del model de regressió de Cox i el model de Fine i Gray en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF.....	52
Taula IV.7. Freqüències absolutes i relatives en funció de l'estat i la presència d'insuficiències de fetge o ronyó i disfuncions renal i/o cerebral.....	54
Taula IV.8. Probabilitats de morir en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral.....	55
Taula IV.9. Resultats del model de regressió de Cox i el model de Fine i Gray en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral	55
Taula IV.10. Resultats dels models univariats de Fine i Gray amb els marcadors d'inflamació com a covariables	57
Taula IV.11. Resultats del model final mitjançant Fine i Gray	58
Taula VII.1. Resultats del test de Shapiro-Wilk.....	65
Taula VII.2. Descriptiva de les característiques generals segons la mortalitat per un seguiment de 28 dies.....	66

Taula VII.3. Descriptiva dels nivells dels marcadors d'inflamació segons la mortalitat per un seguiment de 28 dies	67
Taula VII.4. Descriptiva de les característiques generals dels pacients segons la mortalitat per un seguiment de 180 dies	68
Taula VII.5. Descriptiva dels nivells dels marcadors d'inflamació segons la mortalitat per un seguiment de 180 dies	69
Taula VII.6. Comparació de l'agrupació dels pacients predefinida i l'agrupació natural en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF	72
Taula VII.7. Comparació de l'agrupació dels pacients predefinida i l'agrupació natural en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral	73
Taula VII.8. Matriu de correlacions entre els marcadors d'inflamació	74

ÍNDIX DE FIGURES

Figura II.1. Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació	29
Figura II.2. Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació aplicant logaritmes	30
Figura III.1. Representació dels valors individuals dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció del grup de pacient	33
Figura III.2. Representació de les medianes dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció del grup de pacient.....	34
Figura III.3. Representació dels valors individuals dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada en comparació amb ACLF	35
Figura III.4. Representació de les medianes dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada en comparació amb ACLF	36
Figura III.5. Representació dels valors individuals dels marcadors d'inflamació en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral	37
Figura III.6. Representació de les medianes dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral	38
Figura III.7. Representació dels nivells dels marcadors d'inflamació amb clúster en funció del grup de pacient	39
Figura IV.1. Il·lustració de fallida (X) i censura (O)	42
Figura IV.2. Diagrama de riscos competitiu	44
Figura IV.3. Il·lustració de fallida (X), censura (O) i trasplantament (T).....	45
Figura IV.4. Corbes d'Incidència Acumulada per a la mortalitat en funció del grup de pacient	48
Figura IV.5. Representació de les corbes log-log per avaluar la hipòtesi de riscos proporcionals en funció del grup de pacient	50
Figura IV.6. Corbes d'Incidència Acumulada en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF.....	51
Figura IV.7. Representació de les corbes log-log per avaluar la hipòtesi de riscos proporcionals en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF.....	53
Figura IV.8. Corbes d'Incidència Acumulada en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral	54
Figura IV.9. Representació de les corbes log-log per avaluar la hipòtesi de riscos proporcionals en funció de la presència d'insuficiències de fetge o ronyó i disfuncions renal i/o cerebral	56

Figura VII.1. Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació segons el grup de pacient....	70
Figura VII.2. Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació aplicant logaritmes en funció del grup de pacient	71
Figura VII.3. Representació dels valors individuals dels nivells dels marcadors d'inflamació amb clúster de pacients en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada en comparació amb ACLF	72
Figura VII.4. Representació dels valors individuals dels nivells dels marcadors d'inflamació amb clúster de pacients en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral.....	73

I. INTRODUCCIÓ

1. Nocions teòriques

La cirrosi hepàtica és coneguda com una malaltia degenerativa crònica del fetge caracteritzada per l'acumulació de fibrosi en el teixit hepàtic sa i, conseqüentment, una alteració de les diferents funcions d'aquest òrgan. La cirrosi pot ser deguda a un gran nombre de factors com són, entre d'altres, l'hepatitis viral crònica, el consum elevat d'alcohol i trastorns immunològics o metabòlics. A més, les principals causes de mort en pacients cirròtics són el desenvolupament de carcinoma hepatocel·lular, la sèpsia greu¹, sagnat de les varius esofàgiques i la insuficiència de múltiples òrgans en la fase final de la insuficiència hepàtica.

En la cirrosi hepàtica es distingeixen l'etapa inicial, que es coneix com cirrosi compensada, que no té un fort impacte sobre la qualitat de vida, i l'etapa avançada coneguda com cirrosi descompensada. Els individus que pateixen cirrosi descompensada es caracteritzen pel desenvolupament d'una o més complicacions en cirrosi compensada, com són: ascites², encefalopatia hepàtica³, hemorràgia gastrointestinal i/o infecció bacteriana. Aquestes complicacions es coneixen com descompensacions agudes i es poden desenvolupar tant en presència d'insuficiències orgàniques com en la seva absència.

Una forma particular de la descompensació aguda en cirrosi és la síndrome *Acute-on-Chronic Liver Failure* (ACLF), el mecanisme de la qual és una intensa reacció inflamatòria i representa més del 30% dels pacients hospitalitzats per cirrosi. [22] L'ACLF es diferencia de la simple cirrosi descompensada principalment per la presència d'insuficiències orgàniques (fetge, ronyó, cervell, coagulació, circulació i/o respiració) i l'associació d'una elevada taxa de mortalitat a curt termini (28 dies).

Per tal de diagnosticar la gravetat del pacient s'utilitza el *CLIF-Consortium Organ Failure Score* (CLIF-C OF Score), a partir del qual es defineix el concepte d'insuficiència orgànica.

Taula I.1. CLIF-Organ Failure Score

Sistema orgànic	Score=1	Score=2	Score=3
Fetge (mg/dL)	Bilirubina < 6	6 ≤ Bilirubina ≤ 12	Bilirubina > 12
Ronyó (mg/dL)	Creatinina < 2	2 ≤ Creatinina < 3.5	Creatinina ≥ 3.5 o reemplaçament renal
Cervell (West-Haven Criteria)	Grau 0	Grau 1-2	Grau 3-4
Coagulació	INR < 2.0	2.0 ≤ INR < 2.5	INR ≥ 2.5
Circulació	MAP ≥ 70 mm/Hg	MAP < 70 mm/Hg	Vasopressors (per insuficiència circulatòria)
Respiratori			≤200
PaO ₂ /FiO ₂ o	>300	≤ 300 - > 200	≤ 214 / ventilació mecànica (per insuficiència respiratòria)
SpO ₂ /FiO ₂	> 357	> 214 - ≤ 357	

¹ Malaltia en la qual el cos té una resposta greu i inflamatòria a bacteris o altres microorganismes.

² Acumulació de líquid en l'espai que hi ha entre el revestiment de l'abdomen i els òrgans abdominals.

³ Deteriorament de la funció cerebral produïda per l'arribada al cervell de substàncies tòxiques acumulades en la sang que haurien d'haver estat eliminades pel fetge.

Les caselles marcades de color blau indiquen insuficiència del sistema orgànic corresponent i les disfuncions renal i cerebral es defineixen per un nivell de creatinina ≥ 1.5 - < 2 i grau 1-2 del *West-Haven Criteria* (WHC), respectivament. ^[19]

A partir de l'estudi CANONIC (el qual s'explicarà amb detall en el punt II) es van definir tres graus diferents de la síndrome ACLF:

- **ACLF grau I.** Aquest grup inclou tres subgrups: (1) Pacients amb una única insuficiència renal, (2) pacients amb una única insuficiència de fetge, coagulació, circulació o respiració i que, a més, tinguin disfunció renal i/o cerebral, i (3) pacients amb una única insuficiència cerebral i, a més, disfunció renal.
- **ACLF grau II.** Aquest grup inclou els pacients amb dues insuficiències orgàniques.
- **ACLF grau III.** Aquest grup inclou els pacients amb tres o més insuficiències orgàniques.

L'*Acute-on-Chronic Liver Failure* es desenvolupa en el context de l'accentuació del mecanisme d'Inflamació Sistèmica (SI) i l'estrès oxidatiu, ja presents en la cirrosi descompensada. ^[6] Els efectes d'aquestes dues manifestacions poden provocar greus lesions en els sistemes orgànics.

Per una banda, un procés de resposta inflamatòria comporta l'alliberament de grans quantitats de mediadors inflamatoris. Aquests mediadors inflamatoris són petites molècules que consisteixen en lípids, aminoàcids modificats i petites proteïnes que representen informació específica destinada a les cèl·lules amb capacitat d'utilitzar aquesta informació. Dins del grup d'aquestes petites proteïnes es troben les citocines⁴, que desenvolupen un paper clau en el procés d'inflamació. Aquestes molècules poden tenir caràcter proinflamatori, que augmenten la resposta inflamatòria; o antiinflamatori, que atenuen la resposta inflamatòria. Per a un bon funcionament del mecanisme de resposta inflamatòria és necessari el balanç entre les citocines proinflamatòries i antiinflamatòries, ja que una resposta proinflamatòria excessiva podria conduir a lesions no controlades en els teixits.

D'altra banda, un procés d'estrès oxidatiu comporta la sobreproducció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS). Aquestes petites molècules es formen de manera natural com a subproducte de metabolisme normal de l'oxigen i tenen un important paper en la senyalització cel·lular⁵. Per tal d'evitar l'estrès oxidatiu i, en conseqüència, la mort cel·lular, és necessari el balanç entre les ROS i les defenses antioxidants. Els processos d'estrès oxidatiu i de resposta inflamatòria estan estretament relacionats atès que la sobreproducció de ROS pot desencadenar un increment de les citocines de caràcter proinflamatori.

El desenvolupament de disfuncions orgàniques en presència de cirrosi influencien la reduïda prognosi dels pacients que pateixen aquesta malaltia. L'aparició de cirrosi, insuficiències orgàniques (una o més) i, a més, una elevada taxa de mortalitat a curt termini caracteritzen la

⁴ Proteïnes produïdes principalment pel Sistema Immunitari capaces de controlar funcions fisiològiques com són, entre d'altres, la inflamació i la resposta immunitària local i sistèmica.

⁵ Implica la transmissió d'una senyal d'una cèl·lula transmissora a una receptora

síndrome ACLF. Les taxes de mortalitat als tres mesos dels pacients amb cirrosi hepàtica descompensada, ACLF grau I, ACLF grau II i ACLF grau III són del 14%, 41%, 52% i 79% respectivament. [22]

Per a la supervivència és necessari un fetge sa, ja que és capaç de regenerar la majoria de les seves pròpies cèl·lules quan són danyades. La cirrosi provoca el deteriorament lent de l'òrgan hepàtic i, en conseqüència, el seu mal funcionament. Existeixen diferents teràpies per tal de tractar aquesta malaltia depenent de les causes i la gravetat, però en el seu estat avançat l'aparició de complicacions no controlables farien necessari el trasplantament de fetge.

En la pràctica clínica és freqüent l'ús de dos *scores* anomenats *Child-Pugh* i *MELD (Model for End-Stage Liver Disease)* per tal d'avaluar el pronòstic de la cirrosi i, així, poder prioritzar els receptors d'un trasplantament de fetge. El *Child-Pugh Score* mesura cinc criteris diferents de l'1 al 3, on 3 punts indiquen major gravetat:

Taula I.2. Child-Pugh Score

Mesura	1 punt	2 punts	3 punts
Bilirubina	<2mg/dL	2-3mg/dL	>3mg/dL
Albúmina sèrica	>3.5g/L	2.8-3.5g/L	<2.8g/L
INR / Temps de protrombina	>50%	30-50%	<30%
Ascites	Absent	Lleu	Moderada-Severa (Refractaria)
Encefalopatia hepàtica	Absent	Grau I-II	Grau III-IV

A partir de l'anàlisi d'aquesta classificació, un pacient amb una puntuació entre 5 i 6 tindria una supervivència del 100% a l'any. En contrast, per a un individu amb una puntuació entre 10 i 15 s'estimaria una supervivència a l'any del 45%. [10]

Pel que fa al *MELD*, utilitza els valors de les anteriors mesures per tal de predir la supervivència seguint la següent formulació

$$MELD = 3.78 \ln [bilirubina (mg/dL)] + 11.2 \ln [INR] + 9.57 \ln [creatinina (mg/dL)] + 6.43$$

En aquest cas, amb una puntuació de 40 o més, s'esperaria una mortalitat del 72%, amb una puntuació entre 30 i 39 del 63%, amb una puntuació entre 20 i 29 del 20%, entre 10 i 19 del 6% i de 9 o menys la mortalitat seria del 2%. [31]

2. Antecedents

A continuació es presentaran tres articles la lectura dels quals ha estat essencial per a l'elaboració del present projecte.

Acute-on-chronic Liver Failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of Cirrhosis

Aquest article es va publicar l'any 2013 a la revista *Gastroenterology*. Es tracta d'una investigació prospectiva observacional d'una cohort de 1343 pacients hospitalitzats per una descompensació aguda en cirrosi, que té com a objectiu principal establir els criteris diagnòstics per l'*Acute-on-Chronic Liver Failure*. L'anàlisi d'aquest grup de pacients permet estimar una prevalença d'ACLF en els individus cirròtics del 40%. A més a més, s'identifica que la taxa de mortalitat als 28 dies és 15 vegades major en els pacients amb ACLF respecte als que no pateixen la síndrome. D'altra banda, es conclou que la causa de mort més freqüent en els pacients amb aquesta variació de la cirrosi és la insuficiència de múltiples òrgans i s'identifica una excessiva resposta inflamatòria en l'ACLF.

Systemic Inflammation in Decompensated Cirrhosis: Characterization and Role in Acute-on-Chronic Liver Failure

Aquest article va ser publicat l'any 2016 a la revista *Hepatology*. L'estudi proposa la hipòtesi que l'ACLF és l'expressió d'una aguda exageració de la inflamació sistèmica present en la cirrosi descompensada. La cohort d'estudi inclou 522 pacients de l'estudi CANONIC, és a dir, hospitalitzats per cirrosi descompensada, i 40 pacients sans (control). L'anàlisi principal es basa en la comparació del nivell de 29 citocines i l'albumina⁶ oxidada no reversible (HNA2) en els diferents grups de pacients.

Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute-on-chronic liver failure

Aquest article va ser publicat l'any 2014 a la revista *Journal of Hepatology*. L'estudi utilitza les dades dels pacients reclutats per a l'estudi CANONIC i es basa principalment en el desenvolupament d'un nou score (CLIF-C ACLFs) amb una elevada exactitud pronòstica pels pacients que pateixen ACLF. L'anàlisi principal estudia la mortalitat per a un seguiment fins els 28, 90, 180 i 365 dies després de la inclusió a l'estudi i es duu a terme sota la hipòtesi de riscos proporcionals considerant el trasplantament de fetge com a risc competitiu a la mort.

⁶ Proteïna fabricada pel fetge que es troba comunament al plasma sanguini i evita que el líquid s'escapi dels vasos sanguinis, nodreix els teixits i transporta substàncies de naturalesa química molt diversa. Els nivells baixos d'albumina poden indicar malaltia hepàtica.

3. Motivació

El 10 d'abril de 2017 vaig començar a realitzar pràctiques empresarials a la *European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure* (EF-CLIF), que consisteix en una fundació privada sense ànim de lucre l'objectiu de la qual és promoure la investigació i l'educació en la insuficiència hepàtica crònica. Es basa concretament en la millora de la qualitat de vida i l'augment de la supervivència dels pacients amb cirrosi hepàtica.

Existeixen moltes incògnites sobre la diagnosi, la història natural i la prognosi de la síndrome ACLF, tot i que es detecta en un elevat percentatge de pacients hospitalitzats amb cirrosi descompensada. Així, la EF-CLIF va dissenyar el primer estudi prospectiu, el CANONIC, per tal de descriure el concepte, els criteris diagnòstics, els factors precipitants, la història natural i la prognosi de la malaltia.

Un dels projectes en què he pogut participar a la fundació es centrava en definir el rol de la inflamació sistèmica i la mortalitat en els pacients amb cirrosi descompensada, a partir de la cohort de l'estudi CANONIC. L'associació entre l'elevada resposta inflamatòria i l'agreujament de la cirrosi s'ha comprovat mitjançant taules descriptives, mesurant les diferents citocines en cada grup de pacients, comparant els valors i realitzant els testos estadístics adients per a cada cas.

A partir d'aquest projecte es va creure una bona idea trobar una eina visual que permetés relacionar la inflamació dels pacients segons el seu diagnòstic. Així doncs, es va començar a experimentar amb uns gràfics anomenats mapes de calor (*heatmaps*). Va ser una bona oportunitat per aprofundir en el coneixement d'aquesta eina gràfica, atès que no només permet la visualització de l'expressió de diferents molècules, sinó que també és útil per a identificar patrons de comportament entre les diferents citocines o grups de pacients a partir d'anàlisi de clústers.

D'altra banda, en el present treball també es pretén posar en pràctica tècniques d'anàlisi de supervivència que no es treballen durant el grau d'estadística, com és el model de riscos competitiu. La fundació ha estudiat intensament la mortalitat dels pacients que pateixen ACLF, així que seria interessant analitzar-la estratificant pels diferents tipus d'insuficiències orgàniques que es poden desenvolupar i comparar l'evolució en la cirrosi descompensada.

Per últim, aquest projecte ha estat una bona oportunitat per a investigar les eines estadístiques que ofereixen els programes SAS i R. Generalment a la fundació es treballa amb SAS, i cal destacar el seu potencial en el context del muntatge de les bases de dades. Tot i així, per a l'anàlisi dels marcadors d'inflamació ha estat necessària la introducció del Software R, ja que ofereix un ampli ventall de mètodes de visualització de dades. La necessitat de treballar amb els dos programes en paral·lel ha permès trobar els punts forts de cada un d'ells. Així doncs, per a l'elaboració de l'actual investigació serà necessària la utilització dels dos softwares i s'utilitzarà el SAS per a la preparació de les dades i l'R per a dur a terme les anàlisis estadístiques.

4. Objectius

En el present informe es pretén descriure la resposta inflamatòria que desenvolupen els pacients amb cirrosi en els diferents estats de la malaltia i la seva mortalitat.

Per una banda, s'estudiaran els marcadors d'inflamació sistèmica tant en pacients diagnosticats amb ACLF en cirrosi descompensada (ACLF) com en pacients amb cirrosi descompensada sense ACLF (AD), cirrosi compensada (CC) i sans (H). La relació entre l'expressió inflamatòria i l'agreujament de la cirrosi hepàtica en els grups de pacients definits es vol visualitzar mitjançant mapes de calor. A més a més, s'analitzaran aquests patrons d'inflamació estratificant segons els tipus d'insuficiències o disfuncions orgàniques que pateixen els pacients. En aquest punt s'estudiaran possibles associacions entre els marcadors biològics que puguin explicar agrupacions entre pacients a partir de l'anàlisi de clústers, i també s'examinaran les agrupacions naturals entre els pacients en funció de la seva resposta inflamatòria.

D'altra banda, es descriurà la supervivència als 28, 90 i 180 dies dels pacients cirròtics descompensats amb ACLF i sense ACLF, subdividint també els grups de pacients en funció de les lesions orgàniques. En aquest estudi l'esdeveniment d'interès principal serà la mort causada per cirrosi i es considerarà que el trasplantament de fetge modifica la probabilitat de que es doni aquest succés. Per tant, es modelitzarà el temps de supervivència en el cas de riscos competitius considerant el trasplantament de fetge com l'esdeveniment secundari que competeix amb la mortalitat.

Pel que fa al contingut de l'informe, en primer lloc, es farà una descripció dels pacients i les variables de l'estudi CANONIC, així com de la mostra d'individus seleccionada per a la investigació. A continuació es durà a terme l'anàlisi dels marcadors d'inflamació en els diferents grups d'estudi i seguidament, per a les mateixes variables, l'anàlisi de supervivència. Aquests dos apartats contindran individualment l'explicació de la metodologia emprada així com el software utilitzat, els resultats obtinguts i les conclusions de l'anàlisi. Tot seguit, es reflexionarà sobre els resultats obtinguts en una discussió final. Per últim, el codi R utilitzat per a l'obtenció dels resultats de la investigació es trobarà al següent repositori de la plataforma GitHub <https://github.com/carlapitarch/TFG>.

II. ESTUDI CANONIC

El CANONIC (*Chronic Liver Failure (CLIF) Acute-on-Chronic Liver Failure in Cirrhosis*) va consistir en un estudi europeu, multicèntric, observacional i prospectiu, basat en 1343 pacients hospitalitzats per un temps major a 24 hores a causa d'una complicació de la cirrosi hepàtica.

Aquest estudi va ser el primer projecte d'investigació del *CLIF Consortium*, una organització que en l'actualitat és de 100 hospitals universitaris europeus, formada l'any 2009 i recolzada per l'*European Association for the Study of the Liver (EASL)* i el suport de Grífols. El CANONIC tenia com a objectiu general definir la història natural de l'*Acute-on-Chronic Liver Failure*, avaluar la prevalença i els factors de risc del seu desenvolupament i descriure la mortalitat associada a la malaltia. A més a més, alguns dels objectius específics de l'estudi consistien en estimar la incidència de les diferents insuficiències orgàniques i avaluar la mortalitat dels pacients ACLF als 28, 90, 180 i 360 dies.

Per tal que un pacient fos inclòs a l'estudi CANONIC era necessari que hagués passat més de vint-i-quatre hores tractat a l'hospital pel desenvolupament d'ascites, encefalopatia hepàtica, hemorràgia gastrointestinal, infecció bacteriana, o qualsevol combinació d'aquestes.

D'altra banda, hi havia un seguit de criteris d'exclusió de l'estudi, com són:

- Pacient embarassada
- Pacient menor de 18 anys
- Pacient amb insuficiència aguda o subaguda del fetge sense cirrosi subjacent
- Pacient admès durant més d'un dia per procediments programats
- Pacient d'ambulatori amb cirrosi i ascites refractària, hospitalitzat per menys d'un dia per una paracentesi de gran volum
- Pacient amb cirrosi que desenvolupa alguna descompensació després d'una hepatectomia parcial
- Pacient amb carcinoma hepatocel·lular fora del *Milan Criteria*
- Pacient amb alguna malaltia extra-hepàtica prèvia
- El pacient pren dosis de medicaments immunosupressors diferents als corticosteroides per una hepatitis alcohòlica greu
- Pacient amb VIH
- Pacient que no pot donar el seu consentiment informat ni té un substitut legal per a prendre decisions
- L'equip mèdic no pot atendre a cures intensives si és necessari

Així doncs, inicialment es va fer una selecció de 2149 pacients dels quals 806 van ser exclosos per alguna de les causes esmentades, de manera que, finalment, es van incloure a l'estudi 1343 pacients. Dels pacients inclosos, 303 patien ACLF a la inclusió i 1040 no en patien.

1. Pacients i variables

Fent referència a la investigació actual, s'ha derivat una mostra de pacients del CANONIC afegint un criteri d'inclusió a l'estudi: que els pacients tinguin mostres de sang disponibles. D'aquesta manera, la mostra a analitzar es redueix a 161 pacients amb ACLF i 342 amb cirrosi descompensada.

A més a més, posteriorment a l'anàlisi de l'estudi CANONIC, es va recollir informació demogràfica, clínica i de laboratori a pacients amb cirrosi compensada. Aquest conjunt d'individus havia d'estar lliure de qualsevol descompensació prèvia en cirrosi, de manera que, sota aquesta consideració, la mostra resultant va ser de 39 pacients. D'altra banda, també es van aconseguir mostres sanguínies de 40 voluntaris sans. Finalment, es va crear una base de dades de 582 pacients considerant 40 individus sans, 39 compensats, 342 descompensats i 161 ACLF. Les dades dels individus sans i amb cirrosi compensada es van obtenir per tal de poder fer comparacions de l'expressió inflamatòria en els diferents grups. Així doncs, les anàlisis d'aquesta investigació es realitzaran sobre les 582 observacions, tot i que les dades de mortalitat mancaran pels individus sans i compensats ja que, degut a la inexistent mortalitat d'aquests individus, no se'ls realitza un seguiment al llarg del temps.

Pel que fa a les variables d'estudi, es consideren les característiques generals i clíniques dels individus, un conjunt de marcadors d'inflamació i, per últim, les variables referents al temps de supervivència i l'estat del pacient. En total la base de dades consta de 39 variables, de les quals 11 són categòriques i 28 numèriques.

En referència a les característiques generals i clíniques dels pacients, es disposa de l'edat, el sexe, la Pressió Arterial Mitjana (MAP) i l'etiologia de la cirrosi, que pot ser per alcohol i/o Virus d'Hepatitis C (HCV) o per altres indicacions. Aquestes variables es consideraran a la descriptiva inicial atès que a partir del primer estudi es va trobar que els pacients més propensos a patir ACLF són joves i freqüentment alcohòlics.^[22] Per altre costat, el rang de valors de MAP d'una persona sana està entre 70 i 110 mmHg i a mesura que disminueix per sota del mínim, els òrgans es poden veure privats de la quantitat d'oxigen que necessiten per un correcte funcionament.

D'altra banda, s'analitzaran una sèrie de variables de laboratori com són: l'albúmina, la bilirubina, la creatinina, la proteïna C-reactiva (CRP), l'*International Normalized Ratio* (INR), el recompte de plaquetes, leucòcits (WBC) i nivell de sodi. Pel que fa a les variables de laboratori, una concentració d'albúmina inferior a 3.5 g/dL pot indicar mal funcionament del de fetge i/o ronyó; una bilirubina major o igual a 12 assenyala insuficiència hepàtica; un nivell de creatinina major o igual a 1.5 i menor de 2 indica disfunció renal i major de 2 insuficiència renal; el nivell de la Proteïna C Reactiva incrementa excessivament en els processos inflamatoris; un valor d'INR igual o superior a 2.5 indicaria fallida de coagulació i, també, un recompte de plaquetes inferior a $150 \times 10^9/L$. Per acabar, el rang de leucòcits d'una persona sana està entre 4 i $11 \times 10^9/L$ i una quantitat creixent denota un procés inflamatori o infecció i, pel que fa al sodi, un nivell inferior a 135 mmol/L (que es coneix com hiponatrèmia) pot ser símptoma de deteriorament de fetge i/o ronyons.

En referència als mediadors inflamatoris, com a citocines proinflamatòries es tenen el Factor de Necrosi Tumoral α (TNF α), la Interleucina-6 (IL-6), la Interleucina-8 (IL-8), la Proteïna Químioattractant de Monòcits 1 (MCP-1), l'Interferó gamma-Proteïna Induïble 10 (IP-10), la Proteïna Inflamatòria de Macròfags 1 β (MIP-1 β), el Factor Estimulant de Colònies de Granulòcits (G-CSF) i el Factor Estimulant de Colònies de Granulòcits i Macròfags (GM-CSF). D'altra banda, com a proteïnes antiinflamatòries es consideren la Interleucina-10 (IL-10) i la Interleucina-1 antagonista del receptor (IL-1ra). A més, en l'estudi també s'han inclòs diferents citocines amb altres propietats en els processos immunològics, com l'Interferó gamma (IFN γ), la Interleucina-17a (IL-17a), la Interleucina-7 (IL-7) i l'Eotaxina. Per últim, en aquest conjunt de variables també s'inclou el nivell d'albumina oxidada no reversible (HNA2) atès que cal considerar el seu paper en els processos oxidatius.

Respecte a la recollida de les mostres de plasma, es van obtenir a partir de tubs *Vacutainer d'àcid etilendiaminotetraacètic* l'any 2011 i els mesuraments de les diferents molècules es van realitzar durant l'any 2015. A partir d'estudis previs s'ha pogut fixar uns límits de detecció dels nivells de cada molècula segons el material utilitzat pel mesurament. En aquest cas, els límits inferiors de detecció són ^[6]:

Taula II.1. Nivells de detecció dels marcadors d'inflamació

Citocina	Límit de detecció (pg/mL)	Citocina	Límit de detecció (pg/mL)
TNFα	0.7	GM-CSF	2.0
IL-6	0.3	IL-10	0.4
IL-8	0.4	IL-1ra	3.0
MCP-1	1.9	IFNγ	0.8
IP-10	8.6	Eotaxina	4.0
MIP-1β	3.0	IL-17a	0.7
G-CSF	1.8	IL-7	0.1

Cal aclarir que es poden trobar petites variacions respecte els nivells de detecció marcats en la referència indicada, atès que s'ha trobat nova informació que ha permès actualitzar aquests límits. Malgrat això, encara no es pot referenciar una publicació amb els límits restablerts.

Pel que fa a les dades de l'estudi, existeixen valors mancants degut a un nivell indetectable, de manera que s'han fixat al nivell de detecció mínim establert. És important tenir en compte aquesta imputació, sobretot de cara a l'anàlisi dels marcadors biològics, ja que podria donar-se el cas que en alguna citocina hi hagués un nombre molt elevat de valors fixats al mínim detectable.

En relació a la mortalitat dels pacients, la base de dades conté variables que fan referència al temps de supervivència dels pacients amb cirrosi descompensada (sense ACLF) i ACLF amb un seguiment de 28, 90 i 180 dies. A més, també es consideren variables pels mateixos períodes que expliquen l'estat de l'individu en aquell instant, que pot ser censurat, mort o trasplantat.

2. Descriptiva de les dades

Prèviament a realitzar l'anàlisi dels marcadors d'inflamació i l'anàlisi de supervivència, es durà a terme una descripció preliminar de les dades.

En primer lloc, les variables categòriques, com són el gènere i l'etiologia de la cirrosi, es presentaran amb la freqüència absoluta i la freqüència relativa (%). D'altra banda, pel que fa a les variables numèriques, primer de tot cal comprovar si la distribució d'aquestes és normal o no ho és. Aquesta anàlisi es durà a terme mitjançant el Test de Shapiro-Wilk, atès que és un test amb molta potència estadística.^[29] El Contrast de Shapiro-Wilk s'utilitza per a verificar si les dades provenen d'una distribució normal (hipòtesi nul·la) i compara la distribució empírica de les dades i la distribució teòrica. Els resultats dels tests per a les variables numèriques es podran trobar a l'*Annex 1*.

A partir del contrast realitzat, s'han obtingut els estadístics de test i els p-valors associats a cada variable numèrica amb un nivell de significació del 5%. Aquests resultats han permès concloure que per a la única variable que no es pot rebutjar la hipòtesi de normalitat és l'edat, que es representarà a les taules descriptives amb Mitjana \pm Desviació típica. Pel que fa a la resta de variables numèriques, s'ha comprovat que no segueixen una distribució normal i, per tant, es descriuran a les taules amb Mediana (Quartil1 – Quartil3). Excepcionalment, per al conjunt dels mediadors d'inflamació s'indicarà també el percentil 95 i el valor màxim que pot prendre cada un, per tal d'estudiar més detalladament la distribució d'aquestes variables.

Per avaluar quines variables poden explicar les diferències entre les categories d'una variable es realitzaran diferents tests estadístics. En relació a les dades numèriques normals, s'utilitzarà el test t de Student si la variable estratificadora té dues categories; si es comparen més de dos nivells es realitzarà un test ANOVA. Pel que fa a les variables numèriques que no segueixen una distribució normal, s'utilitzarà el test no paramètric de Mann-Whitney-Wilcoxon per a la comparació de dues categories d'una variable; i si es tracten més de dues es farà servir el test de Kruskal-Wallis. Finalment, en referència a les variables categòriques, es mesurarà la discrepància entre les diferents categories mitjançant la prova Chi-quadrat o, en el cas que les freqüències esperades siguin menors a 5 en més del 20% de les caselles, s'utilitzarà la distribució exacta F de Fisher.

Per últim, en aquests tests, es fixarà un nivell de confiança del 99%, és a dir, un nivell de significació $\alpha=0.01$. Tots els contrastos mencionats tenen com a hipòtesi nul·la que la diferència en les respostes mesurades per a les diverses categories és zero, de manera que quan l'estadístic de test resultant sigui gran i, en conseqüència, el p-valor associat sigui menor que 0.01 es rebutjarà H_0 i es dirà que la variable en qüestió té influència en les diferències observades.

A continuació es presentaran un seguit de taules on es descriuran els valors de les diferents variables d'estudi en funció del grup de pacient (sans, compensats, descompensats i ACLF) i, seguidament, de la mortalitat pels diferents temps de seguiment.

Taula II.2. Descriptiva de les característiques generals segons el grup de pacient

Variable	Compensats (n=39)	Descompensats (n=342)	ACLF (n=161)	P
Característiques clíniques				
Edat ⁽¹⁾	59.62 ± 9.19	57.03 ± 11.53	57.27 ± 11.45	0.405
Gènere (Home) ⁽²⁾	23/39 (58.97%)	227/342 (66.37%)	108/161 (67.08%)	0.618
MAP (mmHg) ⁽³⁾	103.00 (93.00-108.00)	83.33 (75.00-92.00)	80.34 (70.50-90.00)	<0.001
Etiologia de la cirrosi				
Alcohol ⁽²⁾	8/39 (20.51%)	157/321 (48.91%)	90/152 (59.21%)	<0.001
HCV ⁽²⁾	17/39 (43.59%)	78/321 (24.30%)	27/152 (17.76%)	<0.001
Alcohol+HCV ⁽²⁾	0/39 (0.00%)	29/321 (9.03%)	17/152 (11.18%)	0.093
Altres ⁽²⁾	14/39 (35.90%)	57/321 (17.76%)	18/152 (11.84%)	<0.001
Dades de laboratori				
Albúmina (g/dL) ⁽³⁾	4.00 (3.80-4.40)	2.90 (2.50-3.20)	3.00 (2.40-3.40)	<0.001
Bilirubina (mg/dL) ⁽³⁾	0.91 (0.70-1.17)	3.10 (1.60-6.98)	6.10 (2.00-14.37)	<0.001
Creatinina (mg/dL) ⁽³⁾	0.75 (0.65-0.89)	0.90 (0.70-1.37)	2.17 (0.98-3.04)	<0.001
CRP (mg/dL) ⁽³⁾	0.35 (0.13-0.70)	18.00 (6.50-41.00)	25.00 (9.70-50.40)	<0.001
INR ⁽³⁾	1.12 (1.07-1.20)	1.50 (1.30-1.76)	1.72 (1.37-2.30)	<0.001
Plaquetes (x10⁹/L) ⁽³⁾	108.00 (72.00-159.00)	89.00 (57.00-136.00)	76.00 (53.00-121.00)	0.049
WBC (x10⁹/L) ⁽³⁾	4.71 (3.65-7.11)	6.29 (4.39-9.40)	8.00 (5.30-12.20)	<0.001
Sodi (mmol/L) ⁽³⁾	141.00 (139.00-142.00)	136.00 (132.00-139.00)	134.00 (130.00-138.00)	<0.001

⁽¹⁾ Mitjana ± desviació típica

⁽²⁾ Freqüència absoluta (freqüència relativa)

⁽³⁾ Mediana (quartil1 – quartil3)

ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure, MAP: Mean Arterial Pressure, HCV: Hepatitis C Virus, CRP: C-Reactive Protein, INR: International Normalized Ratio, WBC: White Blood Cells

En aquesta descriptiva es mostren les característiques generals dels pacients que tenen cirrosi compensada, descompensada i ACLF. No es descriuen aquestes variables dels individus sans atès que només es tenen dades dels marcadors d'inflamació.

A partir de la informació recollida, es veu com l'edat i el sexe no són característiques que marquin diferències entre els grups d'estudi. Pel que fa a l'origen de la cirrosi, es veu el percentatge d'individus amb etiologia alcohòlica és més del doble en el grup de descompensats i ACLF respecte compensats. Respecte a les dades de laboratori, els nivells d'albúmina dels pacients descompensats i ACLF es situen per sota de 3.5, indicant un deteriorament de fetge i/o ronyó. Parant atenció als valors de bilirubina es veu com en el grup ACLF més del 25% d'individus presenten insuficiència hepàtica, atès que el tercer quartil es situa per sobre dels 12 mg/dL. A més, l'increment en el nivell de la CRP i els glòbuls blancs

des de la cirrosi compensada fins a l'ACLF donen indicis d'un augment en la resposta inflamatòria.

Taula II.3. Descriptiva dels nivells dels marcadors d'inflamació segons el grup de pacient

Variable	Sans (n=40)	Compensats (n=39)	Descompensats (n=342)	ACLF (n=161)	P
TNFα (pg/mL) ⁽¹⁾	8.99 (6.52-11.70, 15.58, 18.94)	5.13 (1.76-7.80, 14.06, 16.51)	20.19 (14.45-29.36, 52.04, 138.28)	29.02 (17.38-42.83, 69.27, 291.94)	<0.001
IL-6 (pg/mL) ⁽¹⁾	0.30 (0.30-0.30, 1.57, 3.53)	0.30 (0.30-0.30, 5.64, 5.64)	21.20 (9.84-45.36, 175.15, 1061.00)	35.96 (13.15-106.26, 590.68, 5983.00)	<0.001
IL-8 (pg/mL) ⁽¹⁾	1.56 (0.64-3.33, 6.72, 12.02)	4.75 (1.89-12.11, 27.02, 93.08)	42.38 (22.30-83.92, 314.26, 1478.00)	84.45 (38.64-165.10, 403.99, 5393.00)	<0.001
MCP-1 (pg/mL) ⁽¹⁾	337.12 (217.14-417.05, 490.74, 682.65)	188.77 (39.62-272.57, 381.24, 391.32)	324.28 (229.08-456.31, 847.81, 8123.00)	410.26 (293.88-690.00, 2351.00, 9797.00)	<0.001
IP-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	328.37 (234.61-432.04, 906.59, 2294.00)	426.66 (134.25-828.79, 1693.00, 3085.00)	988.60 (582.30-1764.00, 4319.00, 11013.00)	1141.00 (649.58-2120.00, 4932.00, 13442.00)	<0.001
MIP-1β (pg/mL) ⁽¹⁾	12.54 (6.38-17.18, 30.60, 59.18)	6.59 (3.00-16.63, 59.57, 110.82)	23.14 (13.77-37.50, 104.39, 378.54)	26.23 (17.89-42.55, 132.62, 331.29)	<0.001
G-CSF (pg/mL) ⁽¹⁾	2.08 (1.80-11.04, 39.63, 42.67)	1.80 (1.80-10.70, 44.42, 56.75)	22.99 (11.57-51.32, 233.64, 877.38)	29.90 (13.70-74.33, 1371.00, 12096.00)	<0.001
GM-CSF (pg/mL) ⁽¹⁾	2.00 (2.00-2.00, 4.06, 28.69)	2.00 (2.00-2.00, 16.44, 18.88)	4.77 (2.00-10.86, 60.36, 2120.00)	6.69 (3.36-15.45, 87.06, 710.69)	<0.001
IL-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	0.40 (0.40-0.40, 5.08, 6.11)	0.40 (0.40-2.44, 14.07, 30.40)	3.42 (0.86-9.93, 50.87, 363.27)	5.96 (1.36-23.48, 132.77, 834.51)	<0.001
IL-1RA (pg/mL) ⁽¹⁾	4.54 (3.00-8.74, 68.40, 69.84)	3.00 (3.00-7.80, 277.85, 869.87)	11.45 (5.20-28.35, 153.21, 1179.00)	17.45 (8.39-48.76, 325.19, 1663.00)	<0.001
IFNγ (pg/mL) ⁽¹⁾	0.83 (0.80-5.46, 17.93, 63.77)	0.80 (0.80-4.38, 21.52, 46.20)	6.32 (2.06-19.47, 103.36, 1098.00)	5.99 (2.29-22.15, 121.83, 726.09)	<0.001

Eotaxina (pg/mL) ⁽¹⁾	93.55 (54.14-125.86, 188.44, 201.93)	73.84 (31.56-102.61, 131.76, 134.74)	113.19 (82.64-159.93, 272.26, 2023.00)	122.97 (86.43-176.21, 275.42, 448.96)	<0.001
IL-17A (pg/mL) ⁽¹⁾	0.70 (0.70-2.98, 12.89, 19.03)	0.70 (0.70-0.70, 2.90, 4.45)	3.53 (1.57-11.84, 63.28, 171.52)	4.79 (1.59-14.66, 66.95, 198.95)	<0.001
IL-7 (pg/mL) ⁽¹⁾	0.10 (0.10-0.10, 3.25, 5.48)	0.10 (0.10-0.10, 3.02, 3.96)	2.32 (0.68-8.17, 37.61, 254.43)	3.00 (1.38-8.67, 49.87, 180.51)	<0.001
HNA2 (%) ⁽¹⁾	1.43 (1.13-2.08, 2.86, 4.07)	6.68 (5.51-7.42, 10.06, 11.94)	5.22 (2.65-9.20, 15.91, 26.91)	10.96 (6.25-15.15, 20.99, 30.79)	<0.001

⁽¹⁾ Mediana (quartil1 – quartil3, percentil95, màxim)

ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Com s'ha esmentat prèviament, els nivells d'alguns marcadors d'inflamació dels pacients sans i compensats han requerit la seva fixació al mínim detectable. Aquest fet es pot veure reflectit en aquesta descriptiva, on hi ha casos en que el 75% de les dades es corresponen a aquest límit de detecció, per exemple, la IL-6 o el GM-CSF en el grup sa o la IL-17a en el grup compensat. Aquest fenomen succeeix principalment en aquests dos grups atès que tenen un nivell d'inflamació força més reduït que la resta de pacients.

Es pot notar una tendència creixent en els nivells en sang dels mediadors associada al desenvolupament de la cirrosi hepàtica fins arribar a l'ACLF. S'ha cregut interessant descriure el percentil 95 de cada variable així com el seu valor màxim per tal de veure més detalladament el rang de valors que pren cada marcador i analitzar la presència de dades extremes. En una visió general de la taula, a mesura que empitjora l'estat dels individus el valor màxim de les diferents molècules creix, arribant a unes quantitats força elevades sobretot en els pacients amb cirrosi descompensada sense i amb ACLF. En alguns casos es veu un fort increment del nivell des del percentil 95 fins el màxim, fet que indica valors molt extrems en aquestes variables. Un exemple molt clar és el cas del G-CSF, en què el 95% dels valors en pacients descompensats sense ACLF estan per sota de 1371 i el seu màxim és 12096. Més endavant caldrà tractar aquestes variables per tal de poder dur a terme les comparacions adients entre elles.

Tot seguit, es trobarà una taula descriptiva de les variables en funció de si l'estat de l'individu és viu o mort als 90 dies de seguiment. En aquesta anàlisi s'han inclòs tres variables categòriques que serviran per a estratificar els individus en les posteriors anàlisis. La primera d'elles fa referència al grup de pacient, considerant els individus descompensats sense i amb ACLF atès que dels sans i compensats no es té informació de la supervivència. Les altres dues variables indiquen la presència de disfuncions i/o insuficiències orgàniques en els dos grups de pacients.

S'han exclòs de la descriptiva pacients amb trasplantament de fetge, ja que es tractarà com l'esdeveniment secundari a la mort, i el que interessa observar en aquesta anàlisi prèvia són les variables que caracteritzen la mortalitat dels pacients. Les taules que contenen aquesta mateixa informació als 28 i 180 dies de seguiment es podran trobar adjuntes a l'Annex 2.

Taula II.4. Descriptiva de les característiques generals segons la mortalitat per un temps de seguiment de 90 dies

Variable	Censurats (n=342)	Morts (n=114)	P
Característiques clíniques			
Edat ⁽¹⁾	57.37 +/- 11.71	57.73 +/- 11.38	0.777
Gènere (Home) ⁽²⁾	226/342 (66.08%)	71/114 (62.28%)	0.461
MAP (mmHg) ⁽³⁾	83.33 (73.67- 92.00)	83.33 (75.00- 90.00)	0.681
Etiologia de la cirrosi			
Alcohol ⁽²⁾	173/325 (53.23%)	59/106 (55.66%)	0.663
HCV ⁽²⁾	68/325 (20.92%)	25/106 (23.58%)	0.563
Alcohol+HCV ⁽²⁾	29/325 (8.92%)	9/106 (8.49%)	0.892
Altres ⁽²⁾	55/325 (16.92%)	13/106 (12.26%)	0.253
Dades de laboratori			
Albúmina (g/dL) ⁽³⁾	2.96 (2.53- 3.30)	2.80 (2.30- 3.30)	0.128
Bilirubina (mg/dL) ⁽³⁾	2.70 (1.49- 6.79)	6.84 (2.90- 15.00)	<0.001
Creatinina (mg/dL) ⁽³⁾	0.92 (0.71- 1.58)	1.40 (0.85- 2.24)	<0.001
CRP (mg/dL) ⁽³⁾	17.00 (6.10- 39.80)	31.95 (15.75- 60.00)	<0.001
INR ⁽³⁾	1.44 (1.25- 1.70)	1.85 (1.48- 2.20)	<0.001
Plaquetes (x10⁹/L) ⁽³⁾	91.00 (57.00- 140.00)	82.50 (59.00- 119.00)	0.478
WBC (x10⁹/L) ⁽³⁾	6.26 (4.33- 9.50)	8.63 (5.82- 13.23)	<0.001
Sodi (mmol/L) ⁽³⁾	136.00 (133.00- 139.00)	132.00 (127.00- 137.00)	<0.001
Variables classificatòries d'estudi			
Grup *			<0.001
AD ⁽²⁾	259/342 (82.48%)	55/114 (17.52%)	
ACLF ⁽²⁾	83/342 (58.45%)	59/114 (41.55%)	
Fallides orgàniques (AD) *			0.460
No OD-No OF ⁽²⁾	127/259 (85.23%)	22/55 (14.77%)	
RD-CD ⁽²⁾	87/259 (80.56%)	21/55 (19.44%)	
OF ⁽²⁾	45/259 (78.95%)	12/55 (21.05%)	
Fallides orgàniques (ACLF) *			0.163
LF ⁽²⁾	24/83 (72.73%)	9/54 (27.27%)	
RF ⁽²⁾	32/83 (64.00%)	18/54 (36.00%)	
LF+RD/CD ⁽²⁾	12/83 (46.15%)	14/54 (53.85%)	
RF+CD ⁽²⁾	15/83 (53.57%)	13/54 (46.43%)	

⁽¹⁾ Mitjana ± desviació típica

⁽²⁾ Freqüència absoluta (freqüència relativa)

⁽³⁾ Mediana (quartil1 – quartil3)

* Percentatges per fila.

MAP: Mean Arterial Pressure, HCV: Hepatitis C Virus, CRP: C-Reactive Protein, INR: International Normalized Ratio, WBC: White Blood Cells AD: Acute Decompensation, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure, OD: Organ Dysfunction, OF: Organ Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, LF: Liver Failure, RF: Renal Failure

Els pacients trasplantats (n=47) s'han exclòs d'aquesta anàlisi perquè es considerarà el trasplantament com un esdeveniment secundari a la mort.

En el context de la supervivència, es pot observar com les dades de laboratori, exceptuant les plaquetes i l'albumina, influeixen en la mortalitat dels pacients. El fet que les variables de laboratori mostrin aquesta significació, permet relacionar la mortalitat en els pacients cirròtics amb les diferents insuficiències orgàniques. Per exemple, l'interval de confiança dels mil·ligrams per decilitre de bilirubina en els pacients ACLF inclou el 12, que assenjala insuficiència hepàtica. Aquesta associació entre les dades de laboratori i la mortalitat podria ser un indicatiu de que la supervivència en cirrosi i ACLF està condicionada als diferents tipus d'insuficiències o disfuncions orgàniques. A partir de la descriptiva de les variables que indiquen possibles problemes orgànics sembla que no es troba una associació estreta entre les complicacions orgàniques i la mortalitat, tot i així, serà interessant treballar els models de supervivència per tal de confirmar si el risc de morir varia en funció de les diferents categories.

D'altra banda, també sembla existir una forta associació entre la mortalitat i desenvolupament o no d'ACLF en pacients amb cirrosi descompensada ja que, com es pot veure, el percentatge de pacients ACLF que moren als 3 mesos és d'un 41.55% respecte del 17.52% dels pacients descompensats sense ACLF.

Taula II.5. Descriptiva dels nivells dels marcadors d'inflamació segons la mortalitat per un temps de seguiment de 90 dies

Variable	Censurats (n=342)	Morts (n=114)	P
Marcadors d'inflamació			
TNFα (pg/mL) ⁽¹⁾	20.77 (14.55-30.77)	26.83 (17.41-40.16)	<0.001
IL-6 (pg/mL) ⁽¹⁾	21.18 (9.26-44.65)	34.22 (17.37-97.43)	<0.001
IL-8 (pg/mL) ⁽¹⁾	43.10 (23.27-99.38)	80.51 (44.85-155.59)	<0.001
MCP-1 (pg/mL) ⁽¹⁾	347.41 (246.51-497.68)	373.28 (278.88-576.64)	0.065
IP-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	978.75 (601.76-1785.00)	1112.50 (615.69-2005.00)	0.443
MIP-1β (pg/mL) ⁽¹⁾	23.52 (14.30-38.64)	26.58 (15.52-49.05)	0.117
G-CSF (pg/mL) ⁽¹⁾	23.56 (11.70-56.39)	27.01 (15.57-53.44)	0.393
GM-CSF (pg/mL) ⁽¹⁾	5.08 (2.03-10.86)	6.43 (2.58-14.40)	0.079
IL-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	2.94 (0.84-10.19)	6.10 (1.54-20.18)	0.002
IL-1RA (pg/mL) ⁽¹⁾	12.63 (5.67-35.45)	18.81 (8.37-48.76)	0.008
IFNγ (pg/mL) ⁽¹⁾	6.16 (2.06-19.98)	6.49 (2.54-25.32)	0.390
Eotaxina (pg/mL) ⁽¹⁾	110.11 (77.61-156.10)	127.71 (91.09-177.53)	0.010
IL-17A (pg/mL) ⁽¹⁾	3.53 (1.52-11.39)	4.73 (1.75-17.41)	0.109
IL-7 (pg/mL) ⁽¹⁾	2.41 (0.81-7.36)	3.04 (0.91-12.99)	0.043
HNA2 (%) ⁽¹⁾	4.87 (2.71-9.79)	9.26 (5.50-13.87)	<0.001

⁽¹⁾ Mediana (quartil1 – quartil3)

Els pacients trasplantats (n=47) s'han exclòs d'aquesta anàlisi perquè es considerarà el trasplantament com un esdeveniment secundari a la mort.

A partir d'una primera visió dels nivells dels marcadors d'inflamació segons si els pacients són censurats o morts, es pot veure certa associació entre una forta resposta inflamatòria i el pronòstic de l'individu. Tot i que aquesta relació no es veu tan marcada com en la descriptiva

anterior, per mediadors com per exemple la IL-6 i la IL-8 es veu una clara diferència entre els nivells en pacients censurats i en pacients morts.

Aquesta anàlisi es correspon amb les característiques dels pacients després d'un seguiment de tres mesos, però a la vista de les taules annexades les conclusions serien generalitzables per un seguiment d'un mes i de 6 mesos.

A partir d'aquesta descriptiva preliminar de les dades, s'ha pogut intuir una primera caracterització dels individus d'estudi. Per una banda, sembla que tant el deteriorament dels sistemes orgànics com la inflamació sistèmica marquen diferències significatives entre estar sa, patir una cirrosi compensada, descompensada o ACLF i, a més, aquesta significació també s'ha pogut trobar en relació a la mortalitat.

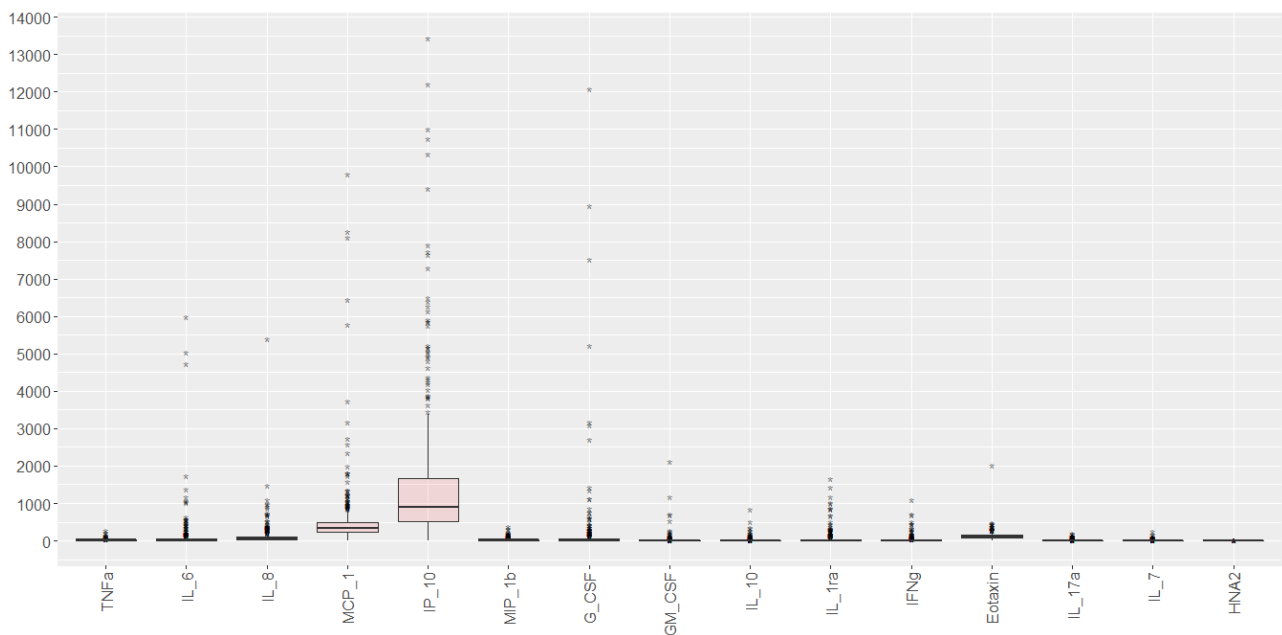
Prèviament a analitzar la resposta inflamatòria dels diferents grups de pacients més detalladament, cal dur a terme un procés de preparació de les variables que fan referència als marcadors d'inflamació.

i. Transformacions de les dades

Primer de tot, per tal d'obtenir una bona representació dels nivells de les molècules, cal que totes les variables estiguin en les mateixes unitats i la mateixa escala. Les variables d'estudi que fan referència a l'expressió inflamatòria prenen rangs de valors força diferents, per exemple, la IL-17a té uns valors de mínim i màxim de 0.70 i 199.00 respectivament, i la IP-10 8.60 i 13442.00. A més, al fixar límits de detecció inferiors en moltes variables hi ha una gran concentració de valors en un mateix punt, de manera que s'observen distribucions molt asimètriques.

Per tal d'entendre millor aquesta situació es dibuixaran diagrames de caixa o *boxplots* per a cada marcador:

Figura II.1. Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació



A partir del gràfic es veu com les distribucions dels diferents marcadors no són gaire similars, fet que posa en relleu la necessitat de dur a terme alguna transformació en les dades, atès que per a la comparació dels nivells d'inflamació de diferents conjunts de pacients cal que les variables es mogui en un rang comú.

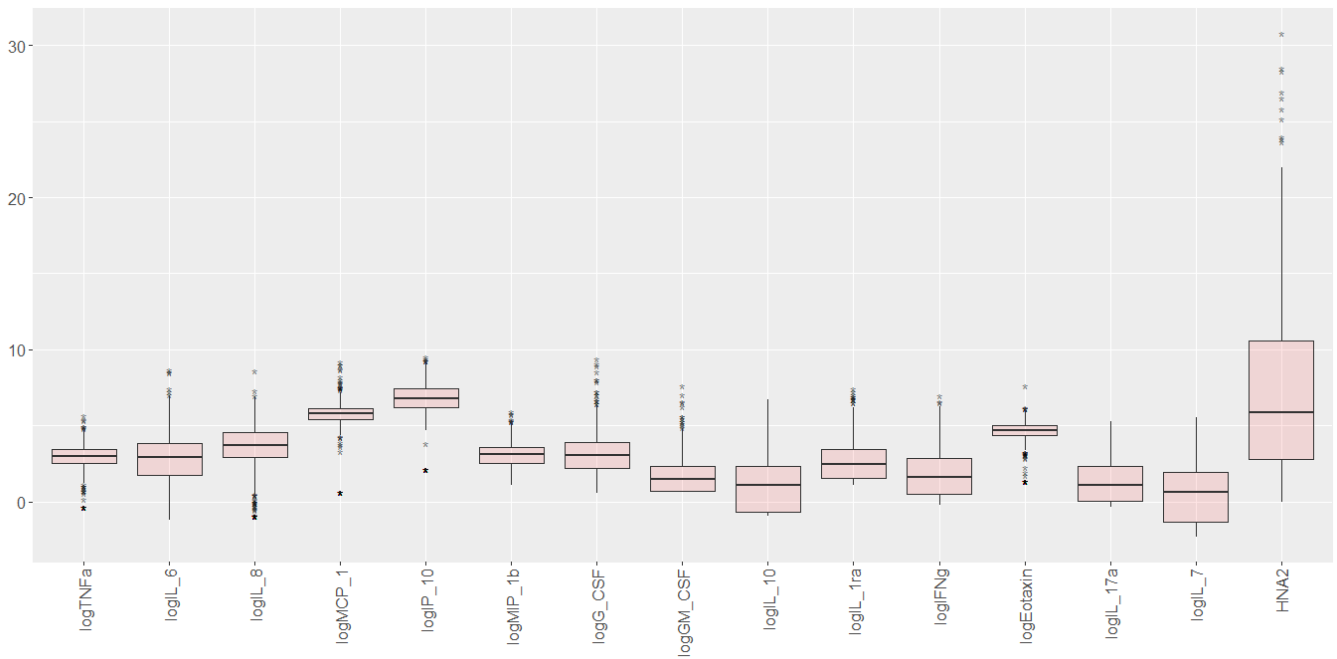
També es pot trobar a l'Annex 3 la mateixa representació estratificada segons el grup de pacient. En aquest cas es veu com els valors més extrems són propis del grup ACLF, mentre aquest tipus de dades es redueix pels individus descompensats, essent gairebé inexistents en els subjectes compensats i sans.

Si es para atenció a la distribució de cada variable es detecten distribucions força asimètriques, amb una freqüència de dades més elevada en els valors petits provocant en alguns casos cues molt llargues per la dreta.

Per tal de tractar aquestes dades, cal aplicar alguna transformació que condueixi a una distribució simètrica i es redueixi la variabilitat. Amb aquest objectiu s'aplicarà una transformació logarítmica a les diferents citocines. La variable que fa referència als nivells d'albúmina oxidada no reversible (HNA2) no requereix transformació atès que està mesurada en percentatge.

Així doncs, mitjançant aquesta transformació, les distribucions resulten:

Figura II.2. Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació aplicant logaritmes



Tal i com es pot veure en aquesta imatge, mitjançant la transformació d'aquest conjunt de variables s'ha aconseguit resoldre la gran asimetria que presentaven les dades. De la mateixa manera que abans, es podran trobar els diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació per a cada grup de pacient a l'Annex 3. En aquesta segona gràfica es veu molt clar com els valors d'albúmina oxidada no reversible (HNA2) es disparen en els pacients amb cirrosi descompensada arribant als valors més elevats en els pacients ACLF.

III. ANÀLISI DELS MARCADORS D'INFLAMACIÓ

1. Metodologia

Una eina estadística principal en l'anàlisi dels sistemes biològics és la visualització de dades genòmiques i proteòmiques utilitzant mapes de calor (o *heatmaps*), que són matrius codificades per colors que indiquen la intensitat (o quantitat) d'una variable dependent. Els mapes de calor són representacions visuals de dades quantitatives en dos eixos; l'eix X que generalment representa observacions individuals i l'eix Y que es compona pels paràmetres mesurats. Així doncs, es tracta d'una eina útil per a explorar agrupacions i patrons entre les dades. ^[26] L'estructura bàsica de les dades per a la creació dels mapes de calor està formada per una variable independent (individus d'estudi) i una matriu de variables dependents (mesuraments de biomarcadors).

Per tant, un *heatmap* mostra la intensitat relativa d'un valor dins d'una matriu. Els valors més elevats es mostraran amb un color més fort (calent) mentre que els que tenen un valor inferior es mostraran amb un color més fred. En el cas que s'estudia, un marcador d'inflamació amb un nivell elevat es pintarà de color vermell i un marcador d'inflamació amb un nivell baix es pintarà de color blau.

A més a més, els mapes de calor poden combinar mètodes de clúster que són útils per tal d'identificar agrupacions en les dades, com són els biomarcadors o els pacients, en funció a la similitud en les seves característiques, en aquest cas, del seu patró d'expressió inflamatòria.

Tal i com s'ha explicat en l'apartat anterior, per tal de representar les dades mitjançant aquest tipus de gràfiques, ha calgut aplicar logaritmes al grup de citocines per tal de treballar la seva variabilitat i asimetria, i apropar els rangs de les variables per fer més fàcil la seva representació comuna. El següent pas consisteix en escalar les variables de manera que totes tinguin mitjana 0 i desviació típica 1. D'aquesta manera, es vol aconseguir que els marcadors d'inflamació siguin comparables entre ells per tal de realitzar la seva representació en forma de mapa de calor. Així doncs, s'utilitzarà l'alternativa de l'escalat estàndard que consisteix en restar a cada observació la mitjana de la variable i dividir per la desviació típica i, així, els valors dels diferents biomarcadors, amb les respectives transformacions, oscil·laran en el mateix rang.

L'últim pas a l'hora de representar el nivell de les molècules en sang dels pacients consisteix en definir l'escala de color. En aquest cas, es fixaran 100 variants diferents entre el color blau i el color vermell, situant el blanc com el valor nul. El color blau més pur representarà el nivell d'inflamació més baix i el color vermell més pur el nivell més elevat, sempre considerant que es treballa amb les variables transformades i escalades.

Finalment, pel que fa a l'anàlisi de clústers o conglomerats, es tracta d'una metodologia utilitzada per tal d'agrupar individus o variables que comparteixen certes característiques a partir únicament de la informació que contenen les dades. En aquest estudi es vol trobar una possible classificació natural dels marcadors d'inflamació a partir de la prèvia definició dels

grups d'estudi i, per altra banda, estudiar si l'agrupació natural dels pacients es correspon amb els grups prèviament establerts.

La creació dels conglomerats pot realitzar-se a partir de diferents metodologies depenent dels algorismes utilitzats, que poden ser d'iteració o d'aglomeració. Els mètodes iteratius (com el *K-means*) es basen en la utilització del resultat de la iteració anterior per tal de millorar l'agrupació obtinguda. Pel que fa als algorismes d'aglomeració, cada element es troba aïllat inicialment i successivament s'agrupen els dos elements més similars fins a obtenir un clúster (grup homogeni d'individus o marcadors). En el cas del *K-means* és necessari definir prèviament un número k, que serà el nombre de grups en què es dividirà la mostra. En canvi, per treballar amb mètodes jeràrquics aglomeratius no és necessari predefinir aquest nombre. Per a aquest estudi s'ha decidit agrupar les variables i els individus mitjançant un algorisme d'aglomeració, atès que no es té un coneixement previ del nombre de possibles classes de marcadors d'inflamació en funció del seu nivell.

El primer pas per a dur a terme aquesta anàlisi, consisteix en definir la mesura de distància per a establir la proximitat entre els individus o variables, que en aquest cas serà la distància euclidiana. Aquesta mesura és la distància usual entre dos vectors A i B, que es calcula com:

$$d(A, B) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (a_i - b_i)^2}$$

En segon lloc, per a treballar amb mètodes d'aglomeració, cal derivar a partir del conjunt de dades inicial una nova matriu de distàncies que determini la proximitat o llunyania entre parells de subjectes d'estudi. Aquesta matriu s'obté a partir de les dades transformades i escalades.

Per últim, cal especificar l'algorisme d'aglomeració que s'utilitzarà per a la creació dels clústers, és a dir, la funció que decidirà de quina forma es quantificaran les semblances o diferències entre els individus o marcadors d'inflamació. Existeixen diferents alternatives per tal d'agrupar les dades. En el present cas s'aplicarà un dels algorismes més utilitzats, el *Complete Linkage Method*, que classifica els elements en clústers tenint en compte la màxima dissimilitud entre els seus elements, és a dir, la mínima distància entre dos clústers és el màxim de les distàncies entre parells d'individus.

2. Software

Per tal de dur a terme l'anàlisi dels marcadors d'inflamació s'utilitzarà el software R. Per a la representació dels nivells dels marcadors mitjançant mapes de calor es farà servir la funció *heatmap.3* del repositori *biostar-tutorials* de la plataforma *GitHub* (<https://github.com/obigriffith/biostar-tutorials/blob/master/Heatmaps/heatmap.3.R>) i per a la posterior anàlisi de clústers s'aplicarà la funció *hclust* del paquet *stats*.

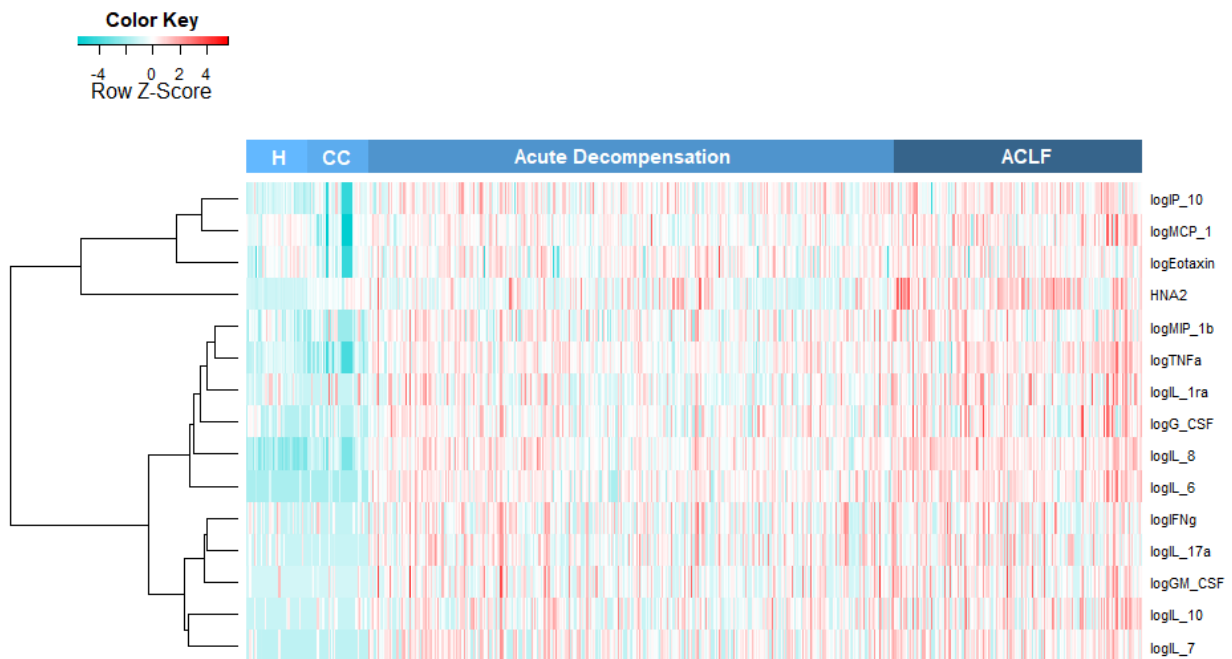
3. Resultats

Tal i com s'ha descrit a l'inici del treball, l'ACLF es desenvolupa en el context de la inflamació sistèmica i l'estrès oxidatiu, que comporten l'alliberament de marcadors d'inflamació i espècies reactives a l'oxigen (ROS), respectivament. En aquest apartat s'exposaran diferents figures en les quals es descriuran els nivells dels quinze marcadors, diferenciant segons el grup de pacient i segons la presència i el tipus de fallida orgànica en els pacients amb cirrosi descompensada amb i sense ACLF. A més a més, aquesta anàlisi es realitzarà tant per les mesures dels pacients de forma individual com en termes de mediana del grup ja que, d'aquesta manera, es podrà obtenir una caracterització general de la inflamació dels conjunts que s'estudien.

i. Anàlisi dels marcadors segons el grup de pacient

Per començar, es presentaran dues gràfiques que mostren el patró d'inflamació dels pacients sans, amb cirrosi compensada, amb cirrosi descompensada sense i amb ACLF, dibuixant els valors per individu i en mediana segons grup i marcador.

Figura III.1. Representació dels valors individuals dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció del grup de pacient



H: Healthy, CC: Compensated Cirrhosis, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Figura III.2. Representació de les medianes dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció del grup de pacient



ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

A partir de la primera descriptiva de les dades s'ha pogut concloure com els nivells dels mediadors incrementen significativament a mesura que empitjora l'estat del pacient, o viceversa (Taula II.3). La representació visual d'aquests nivells, tant en valors individuals com en medianes, permet veure clarament com els pacients sans i compensats es mouen dins de tonalitats força blaves mentre que els pacients amb cirrosi descompensada tendeixen al vermell, que es potencia encara més en els pacients ACLF. Es pot veure la forta semblança que existeix entre els pacients sans i compensats en relació a la inflamació, mentre que en els pacients descompensats i ACLF el patró d'inflamació és totalment diferent. És interessant aquesta gran diferència entre la resposta inflamatòria en els pacients amb cirrosi compensada i descompensada, atès que només es diferencien per l'aparició d'alguna complicació (ascites, encefalopatia hepàtica, hemorràgia gastrointestinal i/o infecció bacteriana). Així doncs es podria dir que l'accentuació del mecanisme d'inflamació sistèmica és una característica de la cirrosi descompensada que s'accentua amb el desenvolupament d'ACLF.

D'altra banda, a partir dels *heatmaps* es pot visualitzar el dendrograma resultant d'aplicar l'algoritme de la distància màxima per tal de formar clústers entre els marcadors d'inflamació segons la seva similitud. El diagrama és diferent segons si les dades s'analitzen de forma individual o a partir de la mediana, així que s'ha decidit donar prioritat a l'agrupació obtinguda amb el primer gràfic, atès que es contempla tota la informació disponible.

Primer de tot es poden observar clarament dues agrupacions dels marcadors, dividint l'àlbumina oxidada no reversible (HNA2), l'Eotaxina, la Proteïna Quimioattractant de Monòcits 1 (MCP-1) i l'Interferó gamma-Proteïna Induïble 10 (IP-10) de la resta. Dins d'aquest grup, la HNA2 forma un clúster individual i com s'ha esmentat té un paper important en els processos oxidatius. A la vista del mapa aquesta molècula adopta una coloració més freda en els

pacients amb cirrosi descompensada sense ACLF mentre que mostra un color vermell molt intens quan els pacients desenvolupen la síndrome i, sorprenentment, sembla que es tenen nivells més elevats en cirrosi compensada que descompensada.

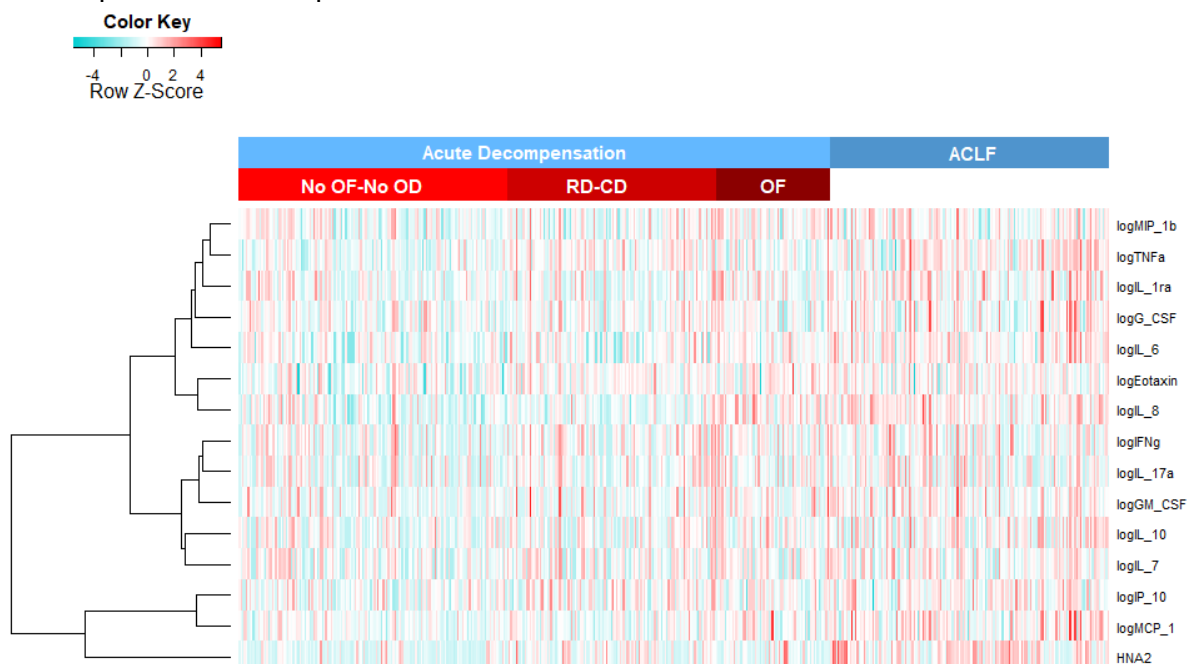
Es podria esperar una divisió entre els tipus de citocines (proinflamatòries i antiinflamatòries) però no s'obté aquesta conclusió. En aquest tipus de gràfiques els valors que es consideren fan referència al nivell de les molècules en sang, per tant, l'anàlisi de clústers es duu a terme tenint en compte el comportament d'aquests nivells però no de les funcions de les citocines. Cal tenir en compte que el nivell de citocines antiinflamatòries augmenta d'acord a la producció de les citocines proinflamatòries ja que cal controlar la producció exagerada d'aquestes per tal d'evitar lesions orgàniques. Així doncs, el nivell de les molècules antiinflamatòries incrementarà i decrementarà d'acord al nivell de les proinflamatòries.

ii. Anàlisi dels marcadors segons la presència de complicacions orgàniques

Com s'havia comentat prèviament, un dels objectius del treball era analitzar la variació en l'expressió inflamatòria dels pacients amb cirrosi descompensada i ACLF segons si patien disfuncions o insuficiències orgàniques. Dins del grup de descompensats es subdivideixen els pacients segons si no pateixen cap insuficiència ni disfunció orgànica (No OF-No OD) disfunció renal o cerebral (RD-CD) o, per últim, alguna insuficiència orgànica (OF). Cal recordar que els pacients amb cirrosi descompensada no poden patir insuficiència renal atès que ja seria grau I d'ACLF.

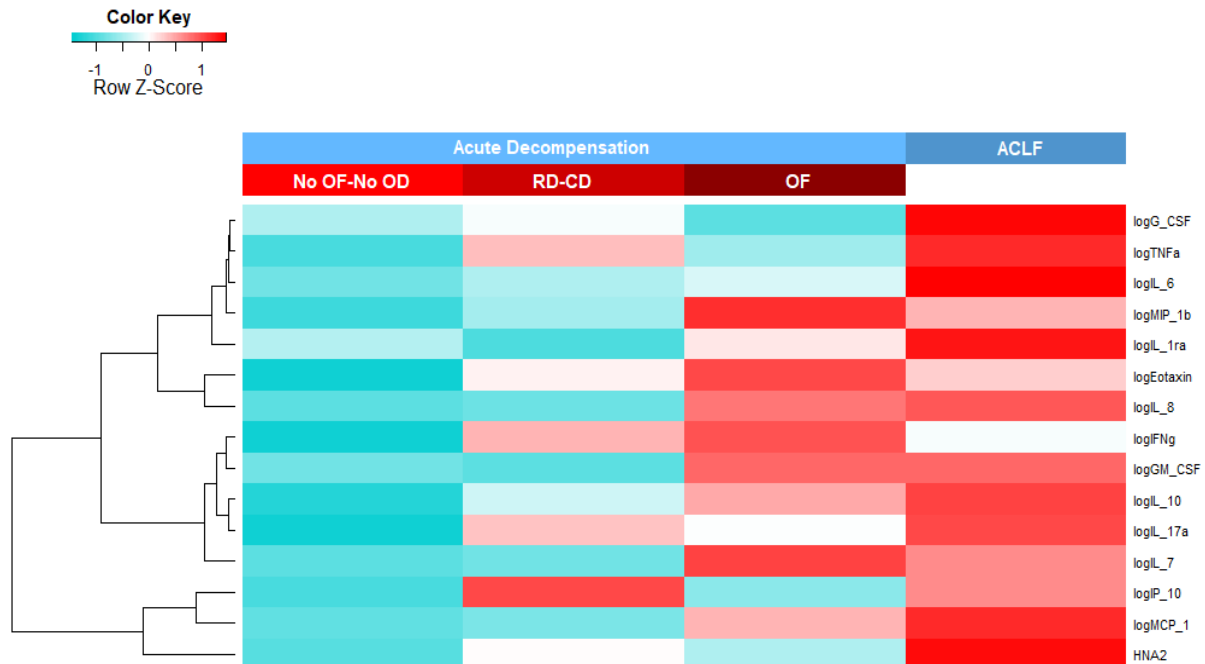
Es presentaran a continuació les gràfiques dels nivells dels mediadors d'inflamació per a aquests pacients.

Figura III.3. Representació dels valors individuals dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada en comparació amb ACLF



OF: Organ Failure, OD: Organ Dysfunction, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Figura III.4. Representació de les medianes dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada en comparació amb ACLF



OF: Organ Failure, OD: Organ Dysfunction, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

En aquest cas, es considera la informació dels pacients amb cirrosi descompensada sense ACLF (n=342) i amb ACLF (n=161), que fan un conjunt de 503 individus. Dins dels pacients amb cirrosi descompensada es tenen 155 sense disfunció ni insuficiència, 121 amb insuficiència renal o cerebral i 66 amb insuficiència orgànica no renal.

En aquesta segona anàlisi no es visualitza un patró d'inflamació tant clar en quant als valors individuals dels pacients, tot i que sí que es pot veure un lleuger increment en els nivells dels marcadors d'inflamació a mesura que empitjora el diagnòstic dels individus. Pel que fa a la gràfica de medianes, permet veure amb més claredat l'accentuació en la resposta inflamatòria dels pacients amb ACLF respecte els pacients descompensats. Dins d'aquest segon grup, s'observa un increment notable en el nivell de MIP-1 β , Eotaxina, IL-8, IFN γ , GM-CSF, IL-10, IL-7 i MCP-1 quan els pacients pateixen alguna insuficiència orgànica, tot i que sembla que la reacció inflamatòria ja està present, encara que de forma més dèbil, en pacients amb disfunció renal o cerebral.

Pel que fa a l'agrupació de les molècules, s'obtenen dos clars grups un dels quals inclou la MCP-1 i la IP-10 per una banda i l'HNA2 per l'altra. L'altra branca també es pot subdividir en dos, separant la IL-7, la IL-17a, la IL-10, e GM-CSF i l'IFN γ de la resta.

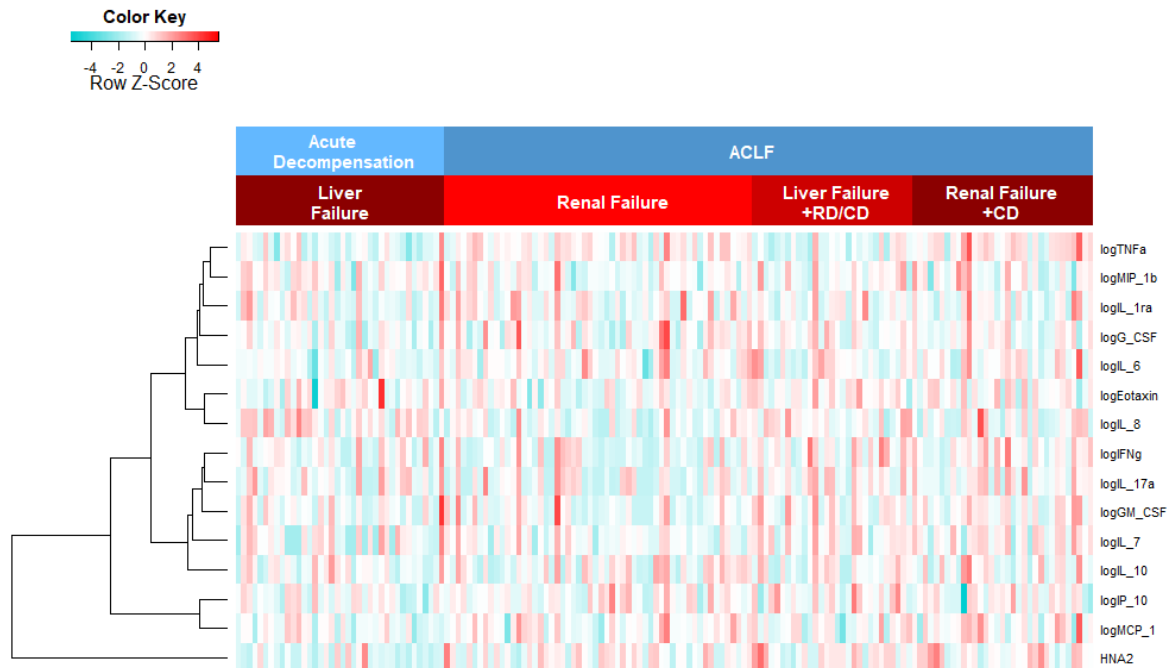
iii. Anàlisi dels marcadors segons tipus de complicacions orgàniques

Una vegada visualitzada la resposta inflamatòria dels pacients amb cirrosi descompensada segons les complicacions que poden patir en els sistemes orgànics, s'ha cregut interessant realitzar aquesta mateixa representació en els pacients ACLF. A partir de l'estudi CANONIC es va veure que les insuficiències orgàniques més freqüents en aquest tipus de pacients són

la insuficiència de fetge i de ronyó. A més, es va trobar que un 64.9% tenia únicament una insuficiència orgànica, un 24.4% en tenia dues i només un 10.6% en tenia tres o més [22]. Així doncs, per a aquest estudi es vol estudiar si existeix variació en la inflamació dels pacients que pateixen insuficiències de fetge (LF) o ronyó (RF) i com varien si a més es combinen amb disfunció renal o cerebral.

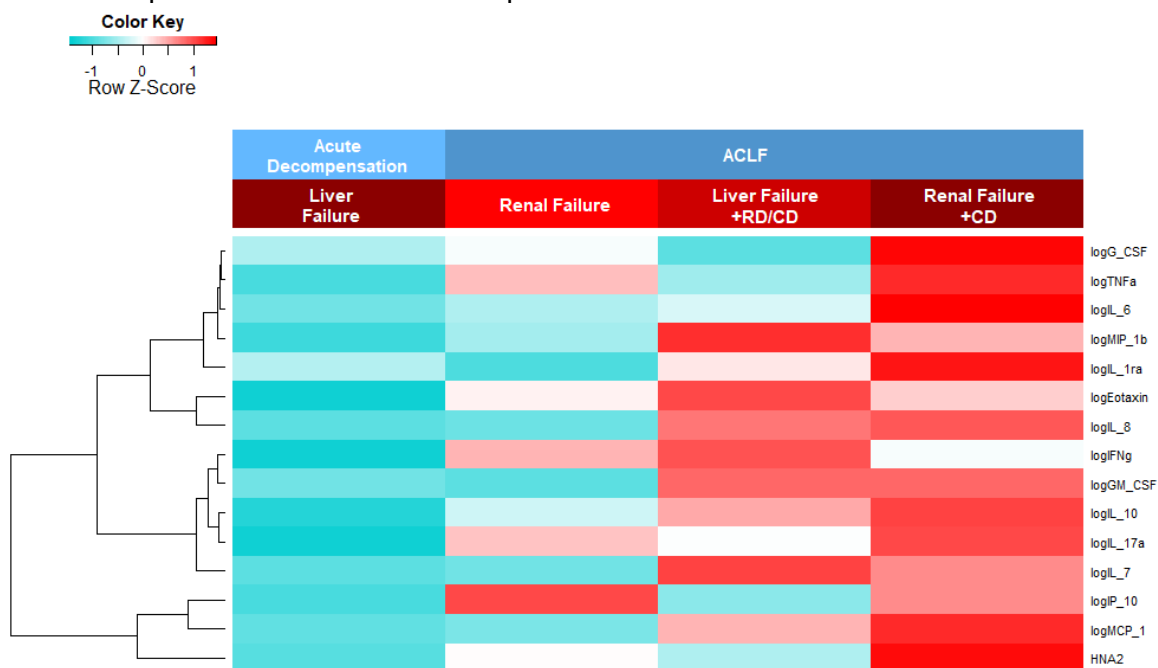
Tot seguit es trobaran dues figures on es representa el patró d'inflamació d'aquests grups de pacients.

Figura III.5. Representació dels valors individuals dels marcadors d'inflamació en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral



RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Figura III.6. Representació de les medianes dels nivells dels marcadors d'inflamació en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral



RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Per a aquesta anàlisi es tenen en compte un total 156 individus, dels quals 38 tenen cirrosi descompensada sense ACLF i 118 amb ACLF. Dins dels pacients amb ACLF es consideren 56 amb insuficiència renal, 29 amb insuficiència hepàtica i disfunció renal i/o cerebral i, per últim, 33 pacients amb insuficiència renal i disfunció cerebral.

A partir dels mapes de calor es pot veure com la resposta inflamatòria dels pacients amb cirrosi descompensada que pateixen insuficiència hepàtica és considerablement menor que la dels pacients amb ACLF, sigui quina sigui la seva complicació orgànica. Si la insuficiència hepàtica es combina amb disfunció renal o cerebral (ACLF) es produeix la reacció d'un conjunt de mediadors de manera que empitjora notablement la inflamació dels pacients. Els individus que pateixen insuficiència renal no desenvolupen un mecanisme d'inflamació molt fort tot i que tenen uns nivells de citocines més elevats que amb insuficiència hepàtica. Si a més de fallida de ronyó es suma disfunció cerebral es desencadena una resposta inflamatòria greu.

En relació a l'agrupació dels marcadors d'inflamació segons el seu nivell, a partir del gràfic de valors individuals, es poden distingir principalment dos clústers clars que posteriorment desencadenarien en tres grups. Per una banda es diferencia el comportament de l'HNA2 del conjunt de citocines, i dins del segon grup es divideixen la MCP-1 i la IP-10 de la resta de citocines.

iv. Anàlisi de l'agrupació natural dels pacients

Ja per acabar la part d'anàlisi dels marcadors d'inflamació, s'ha cregut interessant aplicar les tècniques d'anàlisi de clústers per tal d'avaluar si els pacients s'agrupen de manera natural en els quatre grups d'estudi (sans, cirrosi compensada, cirrosi descompensada i ACLF) en funció de la seva expressió inflamatòria. Per veure-ho es durà a terme el procediment utilitzat per tal

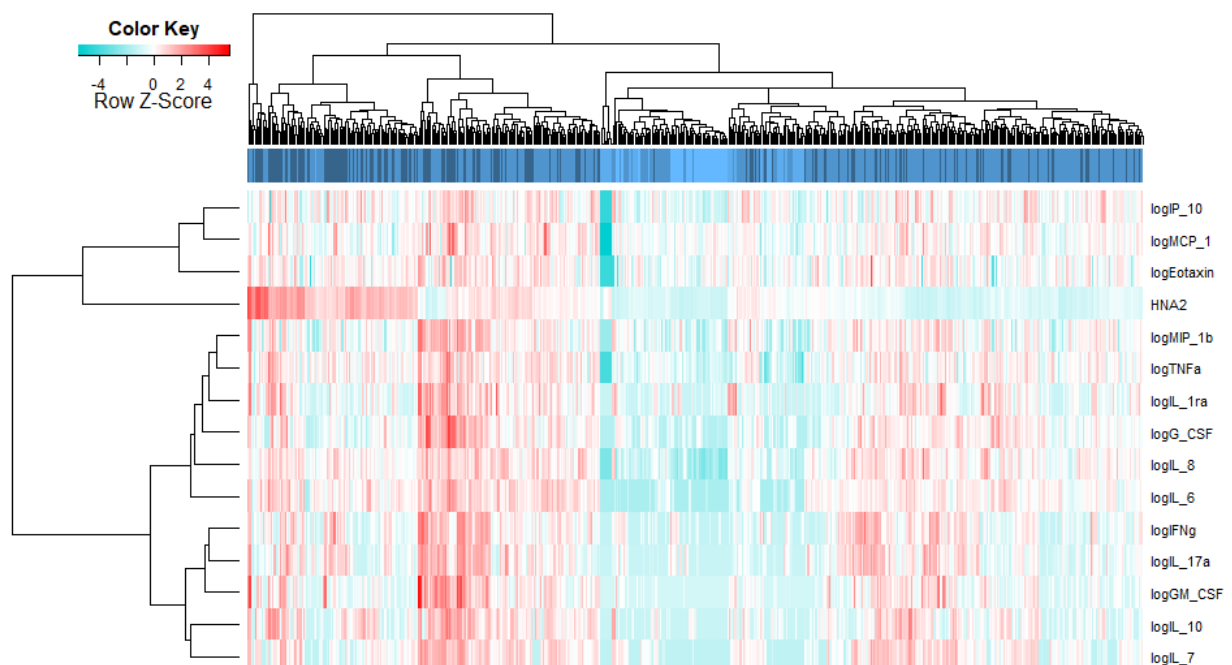
d'agrupar els marcadors d'inflamació però aplicat als individus, de manera que els pacients que comparteixin característiques s'agruparan formant un clúster. El disseny del següent gràfic es correspondrà amb el Gràfic 3.1 en el qual els pacients sans, compensats, descompensats i ACLF adoptaven diferents tonalitats de color blau de més flux a més fort, respectivament. En aquest cas, visualitzarà una línia de color blau per pacient que permetrà interpretar si l'agrupació dels individus respecte el nivell inflamatori es correspon amb l'agrupació predeterminada, en cas que es representin clarament les quatre classes. A més a més, també s'afegirà a la gràfica el dendrograma resultant d'aplicar l'algoritme de la distància màxima als pacients de l'estudi.

A continuació, es trobarà una taula en la qual es podrà veure quantes coincidències hi ha en el grup assignat als pacients i el grup real i, tot seguit, es trobarà aquesta informació reflectida en el dendrograma resultant del mapa de calor.

Taula III.1. Comparació de l'agrupació dels pacients predefinida i l'agrupació natural

Clústers	Sans	Compensats	Descompensats	ACLF
1 (Sans)	40	38	223	52
2 (Compensats)	0	1	39	58
3 (Descompensats)	0	0	74	44
4 (ACLF)	0	0	6	7

Figura III.7. Representació dels nivells dels marcadors d'inflamació amb clúster en funció del grup de pacient



Inicialment, es pot concloure que a partir de l'anàlisi de clústers no es classifica els individus en els quatre grups de pacients, ja que les diferents tonalitats de color blau no formen el patró que es podia veure en el gràfic 3.1 i, a més, a partir del dendrograma no es veuen quatre

branques clares de la mida de cada grup, fet que també es pot comprovar a partir de la taula exposada.

Intuïtivament es podria tallar el dendrograma en dues, tres o fins i tot en dotze classes, però l'interès en aquest estudi és avaluar si realment els individus es classifiquen en els quatre grups d'estudi predefinits, per tant, en aquest treball no es contemplaran altres possibles agrupacions dels individus. Fent un tall en quatre grups, el primer clúster de pacients conté tots els individus sans i la majoria de compensats, descompensats i ACLF, el segon està format per sis compensats i els dos últims grups inclouen tant pacients descompensats com ACLF, de manera que no s'obté una clara classificació dels subjectes. Aquest resultat indicaria que el nivell dels marcadors d'inflamació no és una característica suficient per a la classificació dels pacients en els grups d'estudi, tot i que a la vista dels gràfics anteriors es troba una pauta d'inflamació diferent en cada grup.

Els resultats de la Taula III.1 permeten obtenir un percentatge de bona i mala classificació per a cada clúster i també de forma global. Si tots els individus d'estudi estiguessin classificats al grup al qual estaven assignats prèviament, totes les caselles haurien de prendre valor zero exceptuant la diagonal, que resultaria per ordre d'esquerra a dreta 40, 39, 342 i 161. Per una banda, com tots els individus sans es troben en el primer grup es tindria un 100% de bona classificació d'aquests subjectes, mentre que pels individus compensats es té un 2.56%, pels descompensats un 21.64% i pels pacients ACLF un 4.35%. D'aquesta manera ja es veu que les coincidències en l'agrupació predeterminada dels individus i la seva agrupació natural són força reduïdes. De manera global es troba un 20.96% d'encerts en la formació dels clústers que, dit d'una altra manera, seria un 79.04% de mala classificació. A partir d'aquests resultats es podria veure com tots els individus sans i compensats (menys un) es trobarien dins el mateix grup a partir de la classificació natural. També sembla que els pacients descompensats i ACLF comparteixen característiques atès que es situen en les mateixes agrupacions.

Per últim, s'ha realitzat aquesta mateixa anàlisi pels pacients descompensats i ACLF segons les insuficiències o disfuncions orgàniques. Aquesta anàlisi s'ha dut a terme d'acord amb les de l'apartat anterior, és a dir, per una banda considerant si existeixen o no insuficiències i, per l'altra, especificant el tipus d'insuficiència o disfunció. En aquest punt les conclusions extretes respecte a la classificació natural dels individus en les classes predefinides han estat pràcticament les mateixes, obtenint uns percentatges de bona classificació del 31.61% i del 38.46%, respectivament. Les taules i els mapes de calor corresponents es poden trobar adjunts en l'*Annex 4*.

4. Conclusions

En l'anàlisi dels marcadors d'inflamació dels individus d'estudi s'han considerat diferents punts, com són la caracterització de l'expressió inflamatòria dels diferents grups de pacients i segons les seves complicacions orgàniques, la classificació dels marcadors en funció de la seva reacció i, per últim, l'agrupació natural dels pacients conforme la seva resposta inflamatòria.

Les anàlisis anteriors permeten concloure, en primer lloc, que els pacients sans, compensats, descompensats i ACLF tenen un patró diferent de reacció inflamatòria. La visualització dels nivells dels marcadors d'inflamació dels diversos subjectes ajuden a deduir que la reacció inflamatòria s'accentua a mesura que avança l'estat cirròtic dels pacients, mentre que en els individus sans i compensats és notablement baixa. Així doncs, l'increment dels nivells dels mediadors es manifesta a partir de l'aparició d'alguna descompensació en cirrosi i es potencia al patir ACLF.

En pacients que pateixen cirrosi descompensada és freqüent l'aparició de disfuncions i insuficiències orgàniques. A partir de la representació visual de la resposta inflamatòria d'aquests pacients en funció del seu estat dels sistemes orgànics, sembla que a mesura que empitjora la qualitat del funcionament dels òrgans incrementa el nivell dels marcadors d'inflamació o viceversa, ja que una resposta inflamatòria excessiva pot produir greus lesions en els teixits orgànics.

Les complicacions orgàniques més comuns en pacients cirròtics són la insuficiència hepàtica i renal, que poden combinar-se amb altres complicacions. Un dels interessos d'aquesta anàlisi era avaluar possibles variacions en el nivell dels marcadors d'inflamació segons si les dues insuficiències més presents en pacients cirròtics es combinen amb possibles disfuncions orgàniques, com són la cerebral i la renal (en cas d'insuficiència renal només amb disfunció cerebral). Els pacients que només pateixen insuficiència de fetge pertanyen al grup de cirròtics descompensats sense ACLF i tenen una resposta inflamatòria força baixa, mentre que si a més pateixen alguna disfunció es diagnostiquen com ACLF i el nivell d'alguns mediadors incrementen notablement. Pel que fa a la insuficiència renal, ja sigui independent o no, el pacient és ACLF i té una inflamació més intensa que es realça amb l'aparició de disfunció cerebral.

D'altra banda, a partir de l'anàlisi de conglomerats, s'ha trobat conjunts de marcadors d'inflamació que actuen en concordança en funció de la classificació dels pacients. Atès que s'ha vist la diferència en l'expressió inflamatòria dels subjectes, seria interessant estudiar més detalladament aquests patrons i poder trobar possibles solucions al desencadenament d'una resposta inflamatòria desmesurada.

Per últim, l'aplicació de la mateixa tècnica de classificació als pacients de l'estudi ha permès veure que tot i obtenir un perfil d'inflamació diferenciat entre els grups predefinits dels pacients, a partir d'aquest patró no s'obté de forma natural l'organització esperada. Per tant, es podria dir que l'expressió inflamatòria és una característica descriptiva dels pacients cirròtics però no classificatòria.

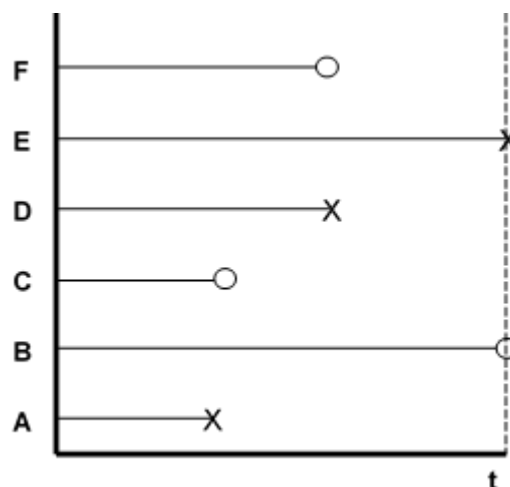
IV. ANÀLISI DE SUPERVIVÈNCIA

1. Metodologia

L'anàlisi de supervivència es basa en un conjunt de procediments estadístics d'anàlisi de dades mitjançant els quals s'estudia el temps que transcorre fins que succeeix un esdeveniment d'interès, com per exemple la recaiguda d'una malaltia o la mort. Sovint es dona el cas que es té informació parcial dels individus d'estudi, és a dir, no es coneix amb exactitud el temps fins que un pacient desenvolupa l'esdeveniment d'interès. Aquestes dades es coneixen com a dades censurades. Generalment, la censura es pot produir perquè el subjecte no ha presentat l'esdeveniment abans de finalitzar l'estudi, perquè s'ha perdut el seguiment del pacient o perquè presenta algun esdeveniment que impossibilita el seu seguiment. Una gran part de les tècniques d'anàlisi de supervivència requereixen el compliment de la hipòtesi de que la censura és no-informativa o independent. Això vol dir que, la probabilitat d'esdevenir censurat és la mateixa per a qualsevol individu que està en el conjunt sota risc en el temps t independentment del pronòstic del pacient en el temps t .

A continuació es pot trobar una il·lustració de la situació explicada, on X fa referència a l'aparició de l'esdeveniment d'interès i O a una dada censurada:

Figura IV.1. Il·lustració de fallida (X) i censura (O)



El tipus de censura que es mostra al diagrama es coneix com a censura per la dreta, és a dir, el temps de supervivència real és major o igual al temps observat. La censura per la dreta és la més habitual, tot i que també pot donar-se censura per l'esquerra, en què el temps de supervivència real seria menor o igual a l'observat. Per exemple, si es vol estudiar el desenvolupament de certa malaltia, es seguirà un conjunt d'individus fins el moment en què la desenvolupin, però el moment en què apareix aquesta malaltia estarà fixat per l'instant en el qual l'individu obté un resultat positiu d'una prova, no es coneixerà el moment d'exposició a la malaltia.

En anàlisi de supervivència es consideren dues funcions primordials: la funció de supervivència $S(t)$ i la funció de risc $h(t)$. La funció de supervivència expressa la probabilitat

de que el temps de supervivència d'un individu sigui major que un temps t , $S(t) = P(T > t)$. La funció de risc o taxa de fallida condicionada reflexa la probabilitat instantània de que l'esdeveniment d'interès ocorri en el temps t condicionat a que el temps de supervivència de l'individu sigui com a mínim t , $h(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(t \leq T < t + \Delta t | T \geq t)}{\Delta t}$.

Per tal de treballar amb dades de supervivència és usual el Model de Cox de riscos proporcionals, que permet representar els efectes d'un conjunt de covariables sobre el temps de supervivència dels individus d'estudi. Sigui $X = (X_1, \dots, X_n)$ un conjunt de n variables explicatives o factors de risc, el Model de Cox pren la següent expressió [7]:

$$h(t, X) = h(t, X_1, \dots, X_n) = h_0(t) \exp \left\{ \sum_{j=1}^n \beta_j X_j \right\} \quad (1)$$

Aquesta expressió conté dos termes diferenciats, la funció $h_0(t)$, que es coneix com la funció de risc basal avaluada en el temps t , i l'exponencial de la suma del predictor lineal, $e^{\{\sum_{j=1}^n \beta_j X_j\}}$. La primera part és dependent del temps però no de les variables explicatives, i la segona part depèn de les variables predictores però és independent del temps.

La formulació del model de Cox permet obtenir la funció de supervivència com:

$$S(t, X) = S_0(t) \exp(\sum_{j=1}^p \beta_j X_j) \quad (2)$$

on $S_0(t)$ fa referència a la funció de supervivència basal avaluada en el temps t .

Aquest model és de naturalesa semiparamètric, ja que conté una part no paramètrica com és la funció de risc basal, atès que és una funció no especificada, i una part paramètrica que es correspon a l'exponencial del predictor lineal, en què s'estimen els paràmetres del model.

Els paràmetres del model, que es denoten per β_j , s'estimen mitjançant el mètode de la màxima versemblança parcial. La versemblança parcial, a diferència de la versemblança total o completa, només fa servir el rang que ocupen els temps de les diferents fallades però no el valor concret del temps. Cox va demostrar que el comportament dels estimadors obtinguts mitjançant aquesta funció és essencialment el mateix dels estimadors de màxima versemblança. [17]

A partir del Model de Cox, s'obté el risc per als diferents individus d'estudi depenent dels valors que tenen en el conjunt de variables explicatives. D'aquesta manera es pot aconseguir una mesura d'efecte que permet quantificar les vegades que té més risc un individu que un altre, partint de la hipòtesi fonamental de que els riscos són proporcionals al llarg del temps. Aquesta mesura es coneix com a *Hazard Ratio* i es calcula com:

$$HR = \frac{\hat{h}(t, X^*)}{\hat{h}(t, X)} = \frac{\hat{h}_0(t) e^{\sum_{i=1}^p \hat{\beta}_i X_i^*}}{\hat{h}_0(t) e^{\sum_{i=1}^p \hat{\beta}_i X_i}} = \exp \left(\sum_{i=1}^p \hat{\beta}_i (X_i^* - X_i) \right) \quad (3)$$

On X^* i X denota el conjunt de variables explicatives per a dos individus diferents.

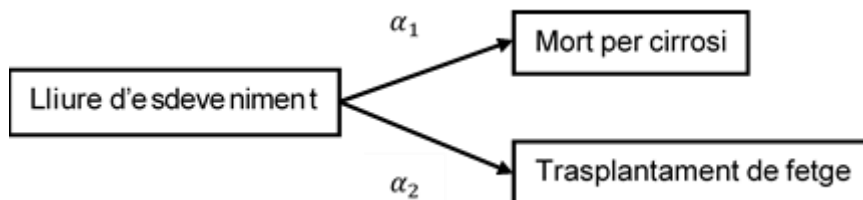
El HR expressa el canvi relatiu en la funció de risc associada a l'increment d'una unitat en la variable predictora. Si s'avalua en el numerador el grup de major risc definit per X^* i en el

denominador el grup de menor risc definit per X , s'espera que el HR sigui major que 1, ja que $\hat{h}(t, X^*) > \hat{h}(t, X)$. D'aquesta manera, el Model de Cox assumeix que els riscos de dos individus amb característiques diferents són proporcionals al llarg del temps, dit d'una altra manera, que les variables predictores no depenen de t : $h(t, X^*) = C \cdot h(t, X)$.

Per tal d'avaluar la hipòtesi de riscos proporcionals, és comú el mètode de les corbes log-log, que consisteix en la representació de $-\ln(-\ln(\hat{S}(t)))$, essent $\hat{S}(t)$ l'estimació de la funció de supervivència, en diferents nivells d'una variable explicativa categòrica. D'aquesta manera, si les diverses corbes resulten paral·leles al llarg de t complirà el supòsit de riscos proporcionals. Una altra opció és dur a terme un contrast d'hipòtesi, en què també es podran avaluar variables numèriques. El test que s'utilitza es basa en els residus de Schoenfeld, que es calculen per a cada variable predictiva i per a cada subjecte que presenta l'esdeveniment. La idea que hi ha darrera d'aquesta prova és que si es compleix la hipòtesi de riscos proporcionals al llarg del temps per a una covariable en particular, els residus de Schoenfeld per aquesta variable no estaran correlacionats amb el temps de supervivència.

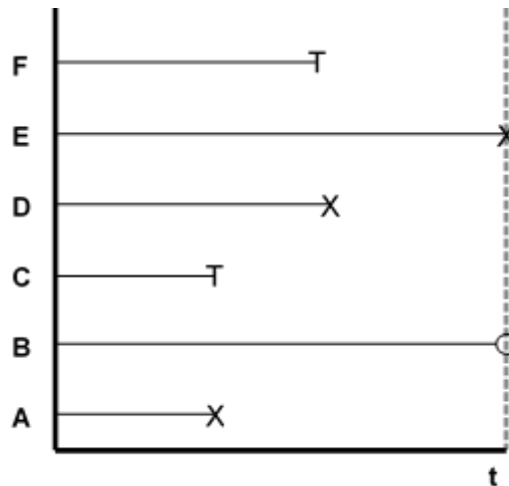
Al principi d'aquest apartat s'ha introduït el concepte de censura no-informativa. Quan existeix més d'un esdeveniment possible però la presència d'un dels esdeveniments modifica la probabilitat d'ocurrència de la resta, la hipòtesi de censura independent no es compleix. Aquests esdeveniments es coneixen com a riscos competitius i la seva presència requereix de l'ús d'una metodologia específica. En el present estudi es considera com a esdeveniment d'interès principal la mort per cirrosi i com a esdeveniment secundari que competeix amb la mort el trasplantament de fetge.

Figura IV.2. Diagrama de riscos competitius



on α_1 i α_2 fan referència a la funció de risc de la mort per cirrosi i el trasplantament de fetge, respectivament. De manera que aquesta situació es pot reflectir de la següent manera:

Figura IV.3. Il·lustració de fallida (X), censura (O) i trasplantament (T)



Tal i com es pot veure alguns individus que abans es tractaven com a censurats realment són pacients que han requerit un trasplantament de fetge. En l'anàlisi estàndard de supervivència, s'assumeix que la probabilitat que un individu sigui censurat en el conjunt sota risc en el temps t no depèn de les característiques de l'individu en el temps t , és a dir, el risc dels individus censurats és el mateix que el risc dels individus que continuen sota seguiment. Aquest concepte en riscos competitius suposaria que la distribució del temps de l'esdeveniment d'interès és independent de la distribució del temps de l'esdeveniment competitiu i , per tant, en qualsevol punt del temps de seguiment el risc de presentar l'esdeveniment d'interès és el mateix pels individus que encara estan sota seguiment que pels individus que ja han presentat un esdeveniment secundari. Certament, les característiques dels individus que reben un trasplantament de fetge canvien per complet respecte la resta de pacients, de manera que no poden seguir la mateixa pauta i l'ús de mètodes d'estimació d'anàlisi de supervivència convencional, com Kaplan-Meier, suposaria una sobreestimació de la probabilitat de fallida. [1][4][12][27]

Per analitzar dades de supervivència en presència de riscos competitius es fa servir la funció de risc de causa-específica i la funció de risc de subdistribució. La funció de risc de causa-específica expressa la taxa instantània de fallida en el moment t per una causa donada c atès que no s'ha fallat per la causa c fins el moment t (en pacients que no han experimentat cap tipus d'esdeveniment competitiu). [4][12][27]

$$h_c(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(t \leq T_c < t + \Delta t | T_c \geq t)}{\Delta t} \quad (4)$$

on T_c fa referència al temps fins a la causa c .

La funció de risc de causa-específica acumulada es defineix com:

$$\Lambda_c(t) = \int_0^t \lambda_c(s) ds \quad (5)$$

i permet estimar la funció de supervivència com la probabilitat de no fallar per cap causa en el temps t , de la següent manera:

$$S(t) = \exp\left(-\sum_{c=1}^C \Lambda_c(t)\right) \quad (6)$$

Es defineix la funció d'incidència acumulada de la causa c , $I_c(t)$, com la probabilitat de fallar per la causa c abans del temps t .

$$I_c(t) = P(T_c \leq t) = \int_0^t \lambda_c(s) S(s) ds \quad (7)$$

Pel que fa a la funció de subdistribució de risc, es pot escriure com:

$$\bar{h}_c(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(t < T_c \leq t + \Delta t | T_c > t \cup (T_c < t \cap C \neq c))}{\Delta t} = -\frac{d \log(1 - I_c(t))}{dt} \quad (8)$$

on β_{jc} és el coeficient pel predictor j segons la causa c . Aquesta funció descriu el risc instantani de fallar per la causa c en individus que encara no han experimentat aquest esdeveniment.

Si es vol estudiar l'efecte d'un conjunt de covariables, es pot fer regressió en la funció de risc de causa-específica (Cox ^[7]) o bé en la funció d'incidència acumulada (Fine i Gray ^[12]). La diferència es centra en el conjunt de risc, si es fa regressió sobre la funció de risc de causa-específica cada vegada que un individu falla per alguna altra causa diferent a la d'interès desapareix del conjunt de risc, en canvi, si es fa regressió sobre la funció d'incidència acumulada aquest individu segueix al conjunt de risc. Aquest concepte pot ser complicat atès que realment un individu que experimenta un esdeveniment competitiu no està a risc per l'esdeveniment d'interès. Fine i Gray van introduir un procediment mitjançant el qual s'aplica un pes decreixent als individus que han desenvolupat un esdeveniment competitiu que romanen al conjunt de risc, en funció del temps de supervivència i la distribució de la censura, és a dir, el pes pels individus que no han fallat per cap causa abans d'un temps t_j és $w_{ij} = 1$ i pels individus que ja han presentat una fallida $w_{ij} \leq 1$. ^{[12][16]}

Els coeficients de regressió que s'obtenen mitjançant la funció de risc de causa-específica es poden interpretar com l'efecte relatiu de la covariable corresponent sobre l'increment relatiu en la taxa de fallida en individus lliures d'esdeveniment. En canvi, la funció de subdistribució permet modelitzar directament l'efecte de covariables en la incidència de l'esdeveniment primari tenint en compte la presència de riscos competitius. ^[4]

D'altra banda, fins el moment no s'ha implementat cap mètode que permeti avaluar el supòsit de riscos proporcionals en aquesta situació. Una alternativa seria fer la comprovació de la hipòtesi en el model de Cox per a l'esdeveniment d'interès, considerant els trasplantats com a censurats. Una manera d'aproximar el model de Fine i Gray mitjançant un model de Cox consisteix en fixar el temps dels individus que presenten l'esdeveniment competitiu al final del temps de seguiment ^[33], de manera que aquests individus mai estarien a risc de presentar l'esdeveniment d'interès. Així es podria aconseguir una bona estimació del model per tal de poder avaluar el supòsit que s'hauria de mantenir al fer regressió sobre les funcions d'incidència.

Per últim, l'estimació de la incidència o probabilitat de fallar per l'esdeveniment c resulta $\hat{I}_c(t_j) = \hat{S}(t_{j-1}) \hat{h}_c(t_j)$ i permet la representació de les Corbes d'Incidència Acumulada (CIC)

mitjançant l'expressió $CIC(t_j) = \sum_{j'=1}^j \hat{I}_c(t_{j'})$. Cada corba expressa la proporció de pacients que ha fallat per la causa c en el temps t tenint en compte que poden fallar per altres causes. El primer pas per a la construcció de la corba consisteix en estimar la funció de risc per a cada temps t_j ordenats, $\hat{h}_c(t_j)$, de manera que s'obté la proporció d'individus que presenta l'esdeveniment c en un temps t . Per tal d'arribar a aquest temps t , se suposa que l'individu ha sobreviscut a tots els possibles esdeveniments, no només al d'interès, aleshores cal calcular la funció de supervivència pel període anterior $S(t_{j-1})$ i, per últim, aplicar l'expressió de $\hat{I}_c(t_j)$. El Test de Gray^[16], permetrà avaluar si existeixen diferències significatives entre K corbes d'incidència acumulada per l'esdeveniment c :

$$H_0: I_c^1 = \dots = I_c^k$$

2. Software

Per tal d'obtenir els diferents resultats en l'anàlisi de supervivència s'utilitzarà el software estadístic R. Per a l'estimació de les corbes d'incidència acumulada es farà servir la funció *cuminc* del paquet *cmprsk*. Per tal de modelitzar el risc de causa-específica s'utilitzarà la funció *coxph* de la llibreria *survival*, mitjançant el qual s'estima el Model de Cox convencional considerant els individus que desenvolupen l'esdeveniment competitiu (trasplantament de fetge) com a censurats. Pel que fa a la modelització del risc de subdistribució es pot utilitzar la funció *FGR* del paquet *riskRegression* o la funció *crr* de la llibreria *cmprsk*, que es basen en l'enfoc de Fine i Gray.

3. Resultats

Prèviament a iniciar l'anàlisi del temps de supervivència dels pacients amb cirrosi, cal aclarir que en aquest context no es tenen dades dels pacients sans i compensats, atès que no van ser pacients reclutats per a l'estudi CANONIC i, per tant, no se'ls va efectuar un seguiment al llarg del temps.

Tal i com s'ha explicat anteriorment, l'ACLF es diferencia de la simple cirrosi descompensada principalment per la presència d'insuficiències orgàniques (fetge, ronyó, cervell, coagulació, circulació i/o respiració) i l'associació d'una elevada taxa de mortalitat a curt termini (28 dies). En aquest apartat, es vol estudiar la mortalitat dels individus amb cirrosi descompensada sense i amb ACLF tractant el trasplantament de fetge com un esdeveniment secundari que competeix amb la mort, per un temps de seguiment de tres mesos.

L'anàlisi es durà a terme mitjançant el càlcul de la incidència acumulada i el Test de Gray per avaluar l'existència de diferències entre les diverses corbes. Seguidament es farà regressió sobre la variable grup de pacient a partir del model de Cox estàndard, fixant el temps de censura dels individus trasplantats al final del seguiment (90 dies), i el model de Fine i Gray de riscos competitius. La incidència acumulada i els models de regressió, s'estimaran també per a la variable que estratifica els possibles problemes orgànics en els individus amb cirrosi descompensada sense ACLF i per a la variable que indica si el pacient pateix insuficiències

hepàtica o renal amb disfuncions cerebral i renal. En últim lloc, s'estudiarà si existeix associació entre l'augment dels nivells dels marcadors d'inflamació i l'increment del risc de morir dels pacients cirròtics descompensats amb i sense ACLF, per mitjà del model de regressió proposat per Fine i Gray de manera univariada i multivariada.

i. Anàlisi de la mortalitat segons el grup de pacient

Pel que fa al grup de pacient, en la taula següent es pot veure el nombre d'individus que moren, es trasplanten o són dades censurades per la dreta per a cada classe.

Taula IV.1. Freqüències absolutes i relatives en funció de l'estat i el grup de pacient

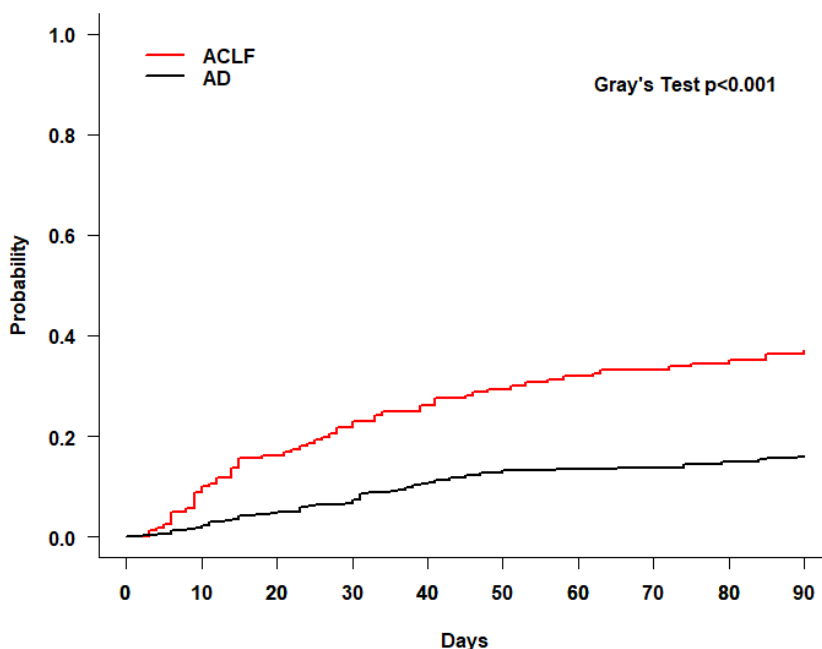
	Morts	Trasplantats	Censurats	Total
AD	55 (16.08%)	28 (8.19%)	259 (75.73%)	342
ACLF	59 (36.64%)	19 (11.80%)	83 (51.55%)	161
Total	114 (22.66%)	47 (9.34%)	342 (67.99%)	503

AD: Acute Decompensation, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

A partir d'aquesta primera descripció de les dades, aproximadament un 37% dels individus ACLF moren als tres mesos enfront d'un 16% dels cirròtics descompensats sense ACLF. També es pot veure el reduït percentatge de pacients que reben un trasplantament de fetge, que seria menys del 10% respecte del total de pacients.

Mitjançant el càlcul de la incidència acumulada per a cada grup i la seva representació gràfica es podran estudiar aquestes diferències.

Figura IV.4. Corbes d'Incidència Acumulada per a la mortalitat en funció del grup de pacient



AD: Acute Decompensation, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Taula IV.2. Probabilitats de morir en funció del grup de pacient

Grup	T=30	T=60	T=90
AD	0.07	0.13	0.16
ACLF	0.23	0.32	0.37

AD: Acute Decompensation, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Les CIC (Corbes d'Incidència Acumulada) permeten deduir com la probabilitat de morir dels pacients que desenvolupen ACLF respecte els pacients cirròtics descompensats que no en desenvolupen és notablement superior. A més a més, mitjançant el Test de Gray, es pot concloure que existeixen diferències significatives entre les corbes d'incidència acumulada pels pacients amb i sense ACLF ja que s'obté un p-valor considerablement menor que 0.05. D'altra banda, la Taula IV.2 mostra la incidència per l'esdeveniment d'interès pels individus de cada grup en diferents moments del temps. La probabilitat de que mori un pacient ACLF és més del doble que la probabilitat de que mori un pacient AD, essent al final del seguiment un 37% i un 16%, respectivament.

Seguidament es podrà trobar una taula amb els resultats de la regressió sobre la funció de risc de causa-específica i sobre la funció de risc de subdistribució amb la variable grup com a regressora:

Taula IV.3. Resultats del model de regressió de Cox i el model de Fine i Gray en funció del grup de pacient

	Cox				Fine i Gray			
	$\hat{\beta}$	SE	HR (IC 95%)	P	$\hat{\beta}$	SE	HR (IC 95%)	P
AD								
ACLF	0.98	0.19	2.67 (1.85, 3.86)	<0.001	0.98	0.19	2.66 (1.85,3.84)	<0.001

AD: Acute Decompensation, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Tal i com es pot veure el resultat entre els dos models és pràcticament el mateix. El p-valor que es mostra a la Taula IV.3 fa referència al Contrast de Wald, mitjançant el qual s'avalua la nul·litat dels paràmetres del model, és a dir, si les variables regressores expliquen la variable resposta. El p-valor obtingut a partir d'aquest test és molt menor que 0.05, de manera que permet concloure que el grup de pacient té efecte en el temps de supervivència.

El *Hazard Ratio* es calcula com el quocient entre el risc per un individu del grup ACLF i el risc per un individu del grup AD, de manera que per a la seva obtenció cal dur a terme el procediment que s'indica a l'equació (3):

$$HR = \frac{h(t, X_1 = 1)}{h(t, X_1 = 0)} = \frac{h_0(t) \exp(\hat{\beta}_1 \cdot 1)}{h_0(t) \exp(\hat{\beta}_1 \cdot 0)} = \exp(\hat{\beta}_1) = \exp(0.98) = 2.66$$

on X_1 fa referència a la variable *grup* que val 1 si el pacient és ACLF i 0 si no ho és.

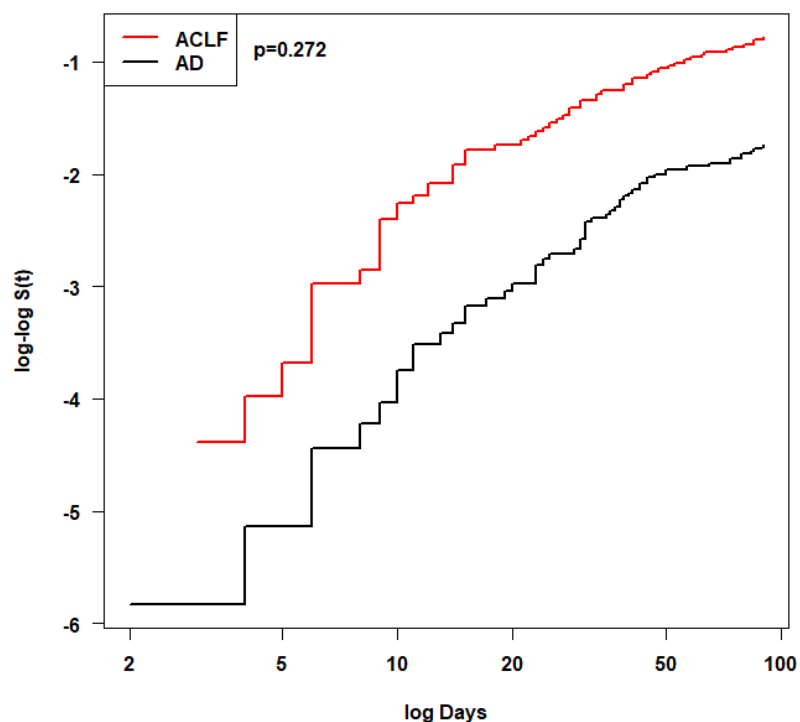
I pel que fa al respectiu interval de confiança considerant un nivell de confiança del 95%:

$$IC(HR; 1 - \alpha) = \left[\exp \left(\hat{\beta}_1 \pm z_{1-\frac{\alpha}{2}} \cdot es(\hat{\beta}_1) \right) \right] = [\exp(0.98 \pm 1.96 \cdot 0.19)] = [1.85, 3.84]$$

Així doncs, com ja s'havia vist mitjançant les corbes d'incidència acumulada, existeix associació entre el grup de pacient i el temps fins a la mort. D'aquesta manera es veu com els pacients ACLF tenen entre 1.85 i 3.84 vegades més risc de morir respecte els pacients sense ACLF.

Finalment, per tal de poder realitzar un model de Cox cal avaluar el compliment del supòsit de riscos proporcionals, és a dir, que el quocient entre el risc dels individus amb i sense ACLF és constant al llarg del temps. Com s'ha comentat anteriorment, aquesta metodologia no està implementada per a un model en què es pot presentar més d'un esdeveniment, per la qual cosa es comprovarà aquesta hipòtesi a partir d'un model de Cox fixant el temps de censura dels individus trasplantats a $t = 90$. El gràfic log-log obtingut és:

Figura IV.5. Representació de les corbes log-log per avaluar la hipòtesi de riscos proporcionals en funció del grup de pacient



AD: Acute Decompensation, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Tal i com es pot observar les corbes no es creuen en cap moment, de manera que no hi hauria cap evidència per a rebutjar la proporcionalitat de riscos. A més a més, mitjançant el contrast basat en els residus de Schoenfeld s'obté un p-valor notablement superior a 0.05. Així doncs, es compleix la proporcionalitat de riscos necessària per tal de poder modelitzar el temps de supervivència en funció del grup de pacient.

ii. Anàlisi de la mortalitat segons la presència de complicacions orgàniques

En aquest subapartat, s'analitzarà el temps fins a la mort amb un temps de seguiment de 90 dies dels pacients cirròtics segons els tipus de disfuncions i/o insuficiències orgàniques que poden presentar els pacients amb cirrosi descompensada sense ACLF.

En primer lloc, cal recordar que pels pacients sense ACLF es considera que poden tenir disfunció renal (RD) o cerebral (CD), una única insuficiència orgànica (OF) sempre que no sigui renal, o bé no tenir cap problema amb els sistemes orgànics. En la taula següent es mostra el nombre de pacients que moren, es trasplanten o es consideren censurats per un temps de seguiment de tres mesos, per a cada una de les situacions esmentades.

Taula IV.4. Freqüències absolutes i relatives en funció de l'estat i la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF

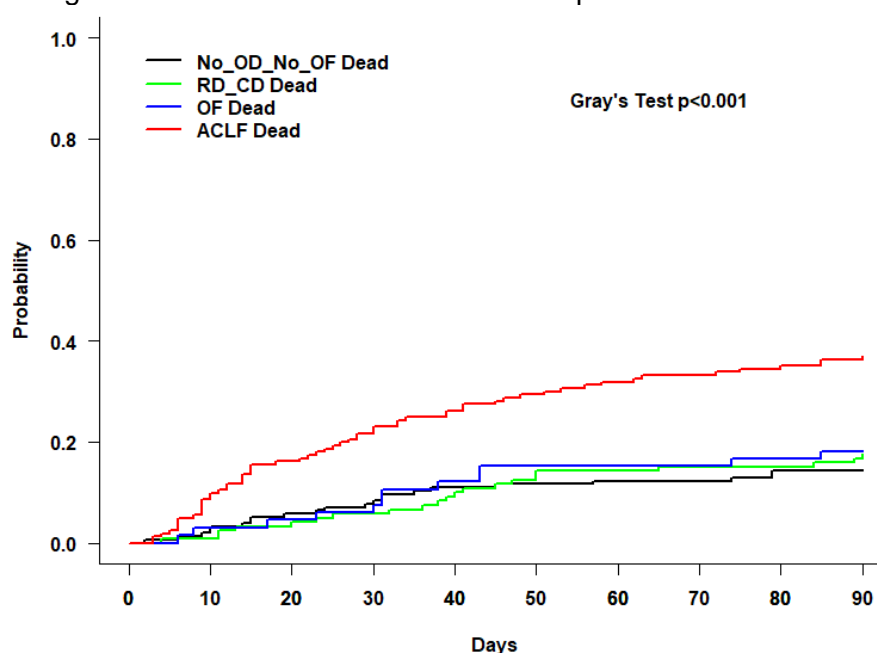
	Morts	Trasplantats	Censurats	Total
No OD-No OF	22 (14.19%)	6 (3.87%)	127 (81.94%)	155
RD-CD	21 (17.36%)	13 (10.74%)	87 (71.90%)	121
OF	12 (18.18%)	9 (13.64%)	45 (68.18%)	66
ACLF	59 (36.65%)	19 (11.80%)	83 (51.55%)	161
Total	114 (22.66%)	47 (9.34%)	342 (67.00%)	503

OD: Organ Dysfunction, OF: Organ Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Sense tenir en compte els pacients ACLF, ja que s'han comentat en l'anàlisi anterior, els pacients que tenen una única insuficiència orgànica no renal tenen el percentatge més elevat de mortalitat als 90 dies (18.18%), seguit dels pacients que pateixen disfunció renal o cerebral (17.36%) i, en últim lloc, es troben els individus amb cirrosi descompensada però sense cap complicació orgànica amb un 14.19%. Aquesta primera descriptiva mostra percentatges de mortalitat força semblants per als diferents grups.

Mitjançant el càlcul de la incidència acumulada d'aquest conjunt d'individus per a cada moment del temps s'obté la següent gràfica:

Figura IV.6. Corbes d'Incidència Acumulada en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF



OD: Organ Dysfunction, OF: Organ Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

Taula IV.5. Probabilitats de morir en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada en comparació amb ACLF

	T=30	T=60	T=90
No OD-No OF	0.08	0.12	0.14
RD-CD	0.06	0.14	0.18
OF	0.08	0.15	0.18
ACLF	0.23	0.32	0.37

OD: Organ Dysfunction, OF: Organ Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

A partir de la representació de les corbes, es veu com la incidència per a les tres categories pertanyents al grup de pacients de cirrosi descompensada sense ACLF és pràcticament igual. A partir dels valors de la funció de subdistribució per a cada categoria, s'observa com la probabilitat de morir en diferents punts del temps és molt similar segons si el pacient no té disfunció ni insuficiència orgànica, disfunció renal o cerebral o insuficiència orgànica. Pel que fa als pacients ACLF anteriorment ja s'ha confirmat que tenen un risc més elevat de morir que els pacients AD. Tot i així, el p-valor del test de Gray és altament significatiu ja que és un test global i indica les diferències existents entre totes les categories de la variable.

Fent referència als models de regressió sobre les funcions de causa-específica i subdistribució, els resultats són:

Taula IV.6. Resultats del model de regressió de Cox i el model de Fine i Gray en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF

	Cox				Fine i Gray			
	$\hat{\beta}$	SE	HR (IC 95%)	P	$\hat{\beta}$	SE	HR (IC 95%)	P
No OD-No OF								
RD-CD	0.21	0.31	1.23 (0.68, 2.23)	0.502	0.21	0.30	1.23 (0.68, 2.22)	0.500
OF	0.26	0.36	1.30 (0.64, 2.61)	0.474	0.26	0.36	1.29 (0.64, 2.60)	0.470
ACLF	1.11	0.25	3.00 (1.86, 4.95)	<0.001	1.11	0.25	3.03 (1.85, 4.95)	<0.001

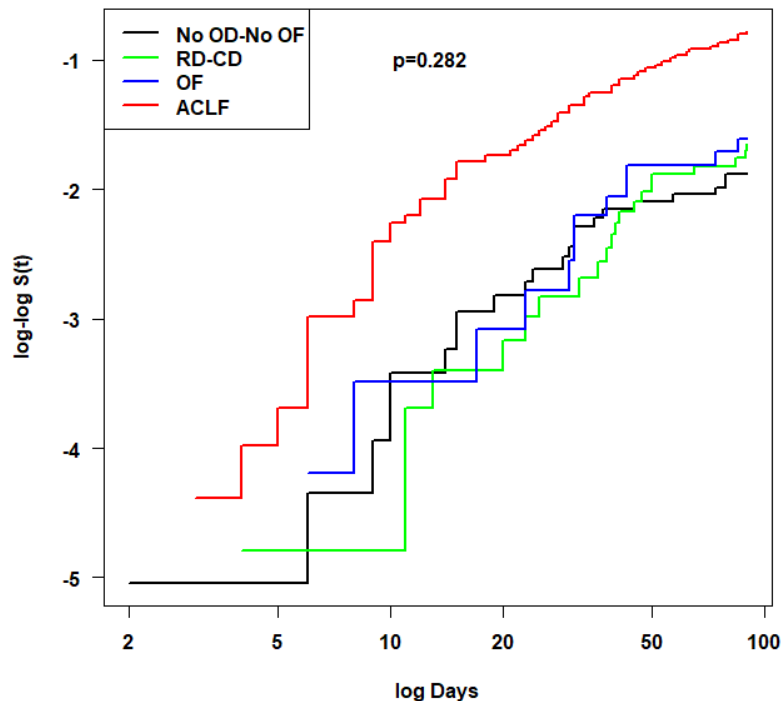
OD: Organ Dysfunction, OF: Organ Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

En aquest cas la variable en qüestió té quatre nivells i s'ha escollit com a nivell de referència l'absència de disfunció o insuficiència de sistemes orgànics. Així doncs, els HR i els respectius intervals de confiança es calcularan respecte aquesta categoria.

Per una banda, es pot veure com en els IC de les categories *RD-CD* i *OF* està inclòs el número 1, i un HR amb valor 1 equival a dir que el risc entre dues categories és el mateix. Així doncs, no es pot dir que existeixin diferències en la mortalitat segons el temps pels pacients que pateixen disfuncions renal o cerebral o insuficiència orgànica respecte els que no en pateixen. Mitjançant les corbes d'incidència acumulada ja s'ha vist com la probabilitat de morir entre aquests pacients era pràcticament la mateixa. Per altra banda, prèviament s'ha conclòs que els pacients ACLF tenen aproximadament 2.66 vegades més probabilitat de morir que el conjunt de pacients AD, i en aquesta nova anàlisi es veu com patir ACLF suposa 3 vegades més risc de morir respecte no patir cap disfunció ni insuficiència orgànica.

Pel que fa a la hipòtesi de riscos proporcionals, les corbes log-log de la funció de supervivència per a cada categoria resulten:

Figura IV.7. Representació de les corbes log-log per avaluar la hipòtesi de riscos proporcionals en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF



OD: Organ Dysfunction, OF: Organ Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure

A partir de la gràfica semblaria que aquesta variable viola la condició de proporcionalitat de riscos, atès que les corbes de les categories pertanyents al grup AD es creuen en diferents punts del temps. Aquests encreuaments no necessàriament han de ser deguts a la no proporcionalitat, sinó que poden ser causats per la similitud i la variabilitat entre les corbes d'incidència acumulada. Mitjançant el test basat en els residus de Schoenfeld, s'obté un p-valor global de 0.282, que expressa que no hi ha prou evidència empírica com per a rebutjar la proporcionalitat de riscos.

iii. Anàlisi de la mortalitat segons tipus de complicacions orgàniques

Pel que fa al grup de pacients ACLF poden presentar insuficiència renal, insuficiència hepàtica amb disfunció renal i/o cerebral o insuficiència renal amb disfunció cerebral. En pacients cirròtics els problemes orgànics més freqüents afecten al fetge i al ronyó, i a partir d'aquesta anàlisi es podrà estudiar alguna possible associació entre la mortalitat i aquests dos tipus de fallides orgàniques.

En la taula que es presenta a continuació es descriu el nombre de pacients que presenta cada esdeveniment per un temps de seguiment de 90 dies segons quina complicació orgànica es pateix.

Taula IV.7. Freqüències absolutes i relatives en funció de l'estat i la presència d'insuficiències de fetge o ronyó i disfuncions renal i/o cerebral

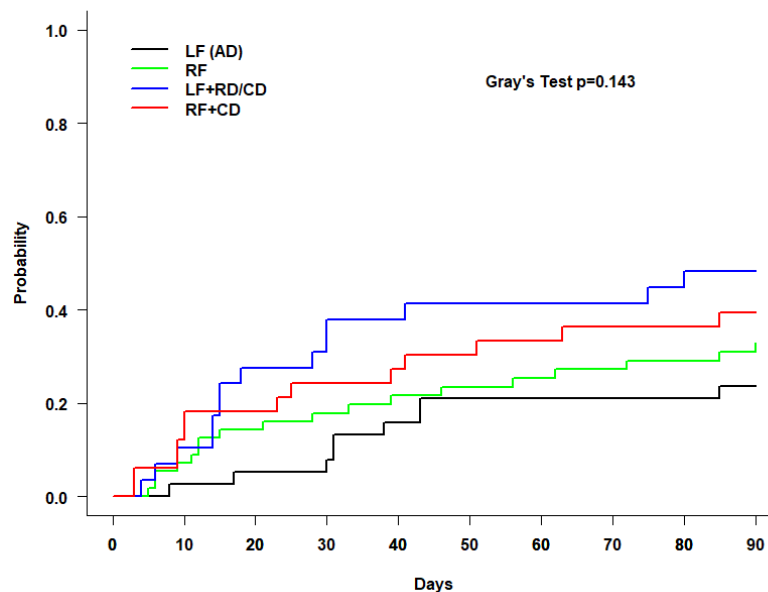
	Morts	Trasplantats	Censurats	Total
LF (AD)	9 (23.68%)	5 (13.16%)	24 (63.16%)	38
RF	18 (32.14%)	6 (10.71%)	32 (57.14%)	56
LF+RD/CD	14 (48.28%)	3 (10.34%)	12 (41.38%)	29
RF+CD	13 (39.39%)	5 (15.15%)	15 (45.45%)	33
Total	54 (34.62%)	19 (12.18%)	83 (53.21%)	156

AD: Acute Decompensation, RF: Renal Failure, LF: Liver Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction

Les freqüències que es mostren a la taula permeten dir que dins del grup de pacients que tenen una insuficiència de fetge junt amb una disfunció renal o cerebral hi ha més mortalitat (gairebé un 50%) que en la resta de grups. Seguit d'aquest grup es troben els pacients amb insuficiència renal més disfunció cerebral (39.39%), insuficiència renal única (32.14%) i, per últim, insuficiència hepàtica única (23.68%).

Seguidament es representaran les corbes d'incidència acumulada per a l'esdeveniment d'interès mort per cirrosi.

Figura IV.8. Corbes d'Incidència Acumulada en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral



AD: Acute Decompensation, RF: Renal Failure, LF: Liver Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction

Taula IV.8. Probabilitats de morir en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral

	T=30	T=60	T=90
LF (AD)	0.08	0.21	0.24
RF	0.18	0.25	0.33
LF+RD/CD	0.38	0.41	0.48
RF+CD	0.24	0.33	0.39

AD: Acute Decompensation, RF: Renal Failure, LF: Liver Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction

Amb els resultats obtinguts es veu com els pacients que tenen la probabilitat més elevada de mort són els que tenen insuficiència de fetge a més d'alguna disfunció, arribant al final del seguiment a una probabilitat de quasi 50%. Contràriament, els individus que tenen una probabilitat més baixa de morir són aquells que únicament tenen insuficiència hepàtica (24% als 90 dies), és a dir, sembla que el fet de patir alguna disfunció renal o cerebral en presència d'insuficiència de fetge augmenta el risc de morir més del doble.

Per un altre costat, els pacients que pateixen insuficiència de ronyó amb disfunció cerebral tenen major probabilitat de mort que els pacients que no tenen disfunció. En aquest cas, tot i que les diferències no són tan notables, la incidència als tres mesos és d'un 39% i un 33%, respectivament.

El test de Gray de comparació de les corbes, proporciona un p-valor força major que 0.05, per tant, amb un nivell de significació del 5% no es pot concloure que existeixin diferències significatives entre les corbes. Atès que es tracta d'un test global per les quatre incidències obtingudes, s'han realitzat els contrastos dos a dos arribant a la mateixa conclusió.

Pel que fa al model de regressió els resultats obtinguts són:

Taula IV.9. Resultats del model de regressió de Cox i el model de Fine i Gray en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral

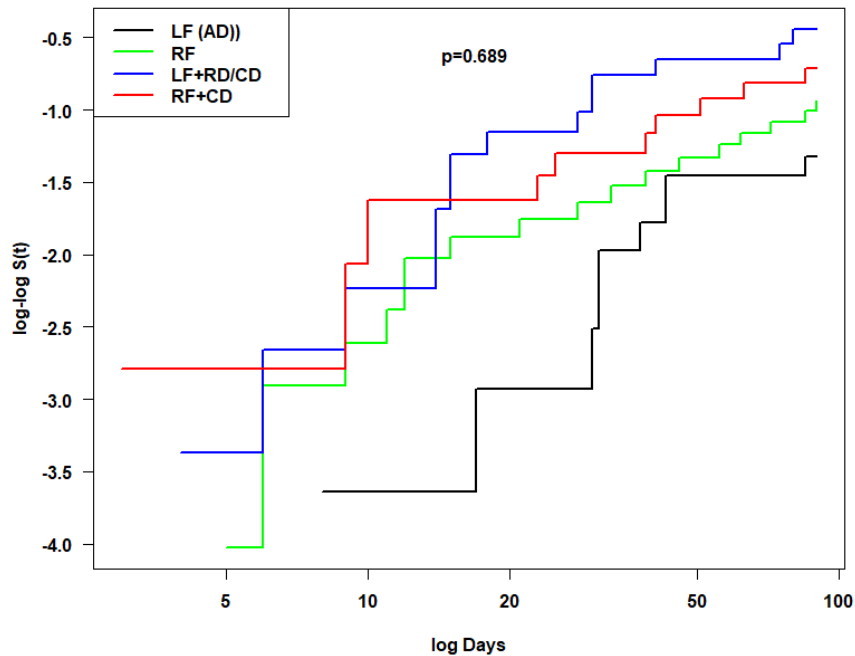
	Cox				Fine i Gray			
	$\hat{\beta}$	SE	HR (IC 95%)	P	$\hat{\beta}$	SE	HR (IC 95%)	P
LF (AD)								
RF	0.40	0.41	1.49 (0.67, 3.33)	0.326	0.40	0.40	1.49 (0.69, 3.25)	0.310
LF+RD/CD	0.93	0.43	2.54 (1.10, 5.88)	0.029	0.93	0.42	2.53 (1.12, 5.74)	0.026
RF+CD	0.66	0.43	1.93 (0.83, 4.52)	0.129	0.66	0.43	1.93 (0.84, 4.45)	0.120

AD: Acute Decompensation, RF: Renal Failure, LF: Liver Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction

Primer de tot, a partir de l'estimació del *Hazard Ratio* per a les diferents categories respecte LF, els pacients que tenen insuficiència renal (RF) i RF amb disfunció cerebral, tenen un 49% i un 93% més de risc de morir que els pacients que tenen únicament insuficiència hepàtica. Tot i així, a la vista dels intervals de confiança es veu com aquestes diferències no són realment significatives, atès que el valor 1 està inclòs dins els intervals. Per altra banda, el fet de patir insuficiència de fetge amb alguna disfunció sí que provoca 2.53 vegades més risc de morir que sense cap disfunció.

En relació al supòsit de riscos proporcionals d'aquesta variable, la representació logarítmica de les corbes de supervivència respecte el logaritme del temps és la següent:

Figura IV.9. Representació de les corbes log-log per avaluar la hipòtesi de riscos proporcionals en funció de la presència d'insuficiències de fetge o ronyó i disfuncions renal i/o cerebral



AD: Acute Decompensation, RF: Renal Failure, LF: Liver Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction

Com ja passava anteriorment, les corbes de la funció de supervivència dels tres grups de pacients ACLF es creuen en diferents moments del temps, per la qual cosa sembla que no es compleix el supòsit de riscos proporcionals requerit per a fer regressió sobre les dades a partir del model de Cox. En aquest cas, l'encreuament es veu principalment en les categories que fan referència a les insuficiències renal i hepàtica més disfunció, on sembla que inicialment el risc de morir de RF+CD és major i a partir del dia 15 aproximadament el risc és menor que en el grup LF+RD/CD. Així doncs, en aquest cas no es pot assumir el supòsit de riscos proporcionals i, per tant, el *Hazard Ratio* no seria constant en el temps.

iv. Anàlisi de la mortalitat segons la resposta inflamatòria

Per últim, atès que s'ha analitzat la resposta inflamatòria dels diferents grups de pacients, s'ha cregut interessant estudiar el temps de supervivència dels pacients amb cirrosi descompensada amb i sense ACLF en funció del nivell dels marcadors d'inflamació. D'aquesta manera es podrà veure si el desencadenament de reaccions inflamatòries tenen influència en la mortalitat als 90 dies per cirrosi.

En primer lloc, es realitzarà una anàlisi univariada de cada variable mitjançant el model de Fine i Gray per tal d'aconseguir una primera intuïció de quins marcadors afecten a la mortalitat dels pacients d'estudi. Les variables s'introduiran al model aplicant logaritmes, atès d'una banda, que el rang de valors que poden prendre és molt gran i, d'una altra banda, per pal·liar

la seva asimetria i l'elevat nombre de valors extrems, com s'ha explicat a partir d'una primera descriptiva de les dades.

Els resultats es mostraran en la taula següent:

Taula IV.10. Resultats dels models univariats de Fine i Gray amb els marcadors d'inflamació com a covariables

Marcador	$\hat{\beta}$	SE	HR (IC 95%)	P
TNFα	0.47	0.14	1.60 (1.21, 2.12)	<0.001
IL-6	0.26	0.06	1.30 (1.16, 1.45)	<0.001
IL-8	0.38	0.07	1.46 (1.27, 1.68)	<0.001
MCP-1	0.25	0.13	1.29 (0.99, 1.67)	0.058
IP-10	0.01	0.12	1.01 (0.80, 1.27)	0.940
MIP-1β	0.19	0.11	1.21 (0.97, 1.51)	0.098
G-CSF	0.05	0.07	1.05 (0.92, 1.20)	0.450
GM-CSF	0.11	0.07	1.12 (0.98, 1.28)	0.100
IL-10	0.15	0.05	1.17 (1.05, 1.30)	0.005
IL-1RA	0.19	0.06	1.21 (1.07, 1.37)	0.003
IFNγ	0.06	0.06	1.06 (0.95, 1.19)	0.310
Eotaxina	0.36	0.17	1.43 (1.04, 1.99)	0.030
IL-17a	0.13	0.07	1.13 (0.99, 1.29)	0.061
IL-7	0.11	0.05	1.12 (1.01, 1.25)	0.037
HNA2	0.06	0.01	1.06 (1.03, 1.09)	<0.001

En models en què la variable predictora és continua el HR s'interpreta com l'increment en el risc de desenvolupar l'esdeveniment d'interès en augmentar una unitat de la covariable. En aquest cas, cal tenir en compte que les variables estan en escala logarítmica, però un exemple seria que l'augment d'una unitat del logaritme del factor de necrosi tumoral α , TNF α , comporta un 60% més de risc de mort.

A partir de la taula 4.10 es veu com l'increment en els nivells d'alguns marcadors d'inflamació, com el TNF α , la IL-6, la IL-8, la IL-10, la IL-1ra, l'Eotaxina, la IL-7 i la HNA2, tenen una influència important sobre la mortalitat en funció del temps dels pacients amb cirrosi descompensada amb i sense ACLF. En la resta de marcadors, el *Hazard Ratio* pren un valor força més proper a 1 de manera que l'increment unitari dels nivells de les citocines no modifiquen el risc de mort.

En segon lloc, es realitzarà un model multivariat amb les variables indicadores d'inflamació com a regressores. Atès el gran nombre de marcadors a considerar i les elevades correlacions que existeixen entre ells, es durà a terme un algoritme de selecció de variables. Per a dur a terme aquest procediment es partirà d'un model que inclogui totes les covariables i en cada pas s'eliminarà la que aportí menys informació al model. Aquest algoritme es coneix com a "Backward Stepwise Regression". El que es pretén mitjançant aquesta metodologia és no incloure informació redundant en el model. Per tal d'avaluar les variables que cal eliminar del model s'utilitzarà el Criteri d'Informació d'Akaike (AIC). Aquest criteri es basa en l'ajust del model i en el nombre de paràmetres: $AIC = -2\log L + 2p$ on L és la funció de versemblança i

p el nombre de paràmetres del model. El procediment es basa en minimitzar l'AIC, de manera que es penalitza el desajust del model i la inclusió de paràmetres.

A partir d'aplicar el mecanisme de selecció de variables al model complert, s'obté:

Taula IV.11. Resultats del model final mitjançant Fine i Gray

Marcador	$\hat{\beta}$	SE	HR (IC 95%)	P
IL-6	0.14	0.06	1.15 (1.01, 1.30)	0.030
IL-8	0.34	0.08	1.41 (1.21, 1.64)	<0.001
HNA2	0.05	0.01	1.05 (1.02, 1.08)	<0.001

Si en comptes d'utilitzar el Criteri d'Informació d'Akaike s'utilitza el Criteri d'Informació Bayesià (BIC), que penalitza en major mesura el nombre de paràmetres a incloure en el model, el model resultant conté únicament la IL-8 i la HNA2 com a variables dependents.

Així doncs, a partir del model obtingut es veu com les citocines IL-6, IL-8, que són de caràcter pro-inflamatori, són les que tenen un major efecte en el temps fins a la mort dels pacients amb cirrosi descompensada amb i sense ACLF. Per altra banda, l'albumina oxidada no reversible (HNA2) també mostra tenir un paper rellevant pel que fa a la mortalitat, i cal recordar que una sobreproducció d'aquesta molècula activa la producció de citocines proinflamàtores. Aquesta conclusió es podia intuir mitjançant la Taula 2.3, que mostra una descriptiva inicial de les variables en funció de l'estat (censurat, mort) dels pacients.

Se sap que la producció de citocines de caire proinflamatori comporta l'alliberament de les molècules antiinflamàtores, per tant, podria ser que una sobreproducció de les primeres i, per tant, una insuficient inhibició del seu efecte per part de les citocines antiinflamàtores provoqués un augment de la probabilitat de morir als 90 dies en els pacients amb cirrosi que pateixen alguna descompensació.

4. Conclusions

A partir de l'anàlisi de la supervivència dels pacients amb cirrosi descompensada s'ha pogut avaluar la possible associació entre un elevat risc de mort en funció del grup de pacient i també segons si els subjectes pateixen insuficiències i/o disfuncions orgàniques. D'altra banda, s'ha estudiat la influència del desenvolupament d'una reacció inflamatòria en la mortalitat dels individus. Aquesta anàlisi s'ha dut a terme considerant la presència d'un segon esdeveniment possible, com és el trasplantament de fetge, a partir de l'enfoc del model de Cox i del model de Fine i Gray (FG).

Primerament, el model de Cox s'ha dut a terme establint els pacients trasplantats com a censurats amb un temps de censura de 90 dies. Les estimacions de la modelització de la funció de risc de causa-específica obtingudes a partir del model de Cox amb aquest enfoc són equivalents a les estimacions que proporciona el model de Fine i Gray sobre la funció de subdistribució considerant el trasplantament de fetge com a esdeveniment secundari que competeix amb la mort.

En segon lloc, s'ha pogut apreciar l'elevada mortalitat dels pacients amb cirrosi descompensada i ACLF. La incidència de la mortalitat al final del temps de seguiment és del 37% en pacients ACLF mentre que en individus sense ACLF és del 16%. A més, un individu ACLF té 2.66 vegades més risc de morir que un individu amb cirrosi descompensada sense desenvolupar ACLF.

A partir de l'estratificació del grup d'individus que no pateix la síndrome segons si presenta o no complicacions orgàniques (disfunció renal o cerebral / insuficiència orgànica no renal), es veu com el temps fins a la mort d'aquest conjunt de pacients no difereix significativament en funció de si presenten o no disfunció o insuficiència orgànica. Mitjançant els models de regressió de Cox i FG, es troba que patir únicament disfunció renal o cerebral o alguna fallida orgànica dins el grup de no ACLF no comporta un major risc de mort respecte els pacients que no pateixen cap alteració dels sistemes orgànics.

D'altra banda, s'ha pogut comparar el risc de mort associat a patir insuficiències de fetge o de ronyó amb i sense disfuncions renal o cerebral. La probabilitat de morir abans dels 90 dies de seguiment és gairebé del 50% pels pacients que presenten insuficiència hepàtica més alguna disfunció i del 24% si no hi ha disfunció, i del 39% pels pacients que pateixen insuficiència renal i disfunció cerebral enfront del 33% si no presenten disfunció cerebral. A partir de la modelització del temps de supervivència en funció d'aquesta covariable, es podria concloure que el risc de patir una disfunció en presència d'insuficiència de fetge provoca 2.53 vegades més risc de mort respecte el fet de tenir únicament una insuficiència de fetge, mentre que no es troben diferències en el temps de supervivència de la resta de categories respecte LF. Tot i les conclusions obtingudes, es conclou que aquesta variable no compleix el supòsit de riscos proporcionals i, per tant, el risc de morir pels diferents pacients no es mantindria constant al llarg del temps.

Per últim, s'ha modelitzat el temps fins a la mort en funció del conjunt de marcadors d'inflamació mitjançant el mètode de FG. A partir del model complert s'ha dut a terme un

procés de selecció de variables basat en la minimització del Criteri d'Informació d'Akaike que ha permès obtenir un model final que inclou les citocines proinflamatòries IL-6, IL-8 i la HNA2. Així doncs, es pot concloure que hi ha associació entre l'augment en el risc de morir per cirrosi i el desencadenament de la resposta inflamatòria en individus amb cirrosi descompensada.

V. DISCUSSIÓ

Una vegada finalitzat el projecte, es procedeix a discutir tant el seu potencial com les limitacions que s'han trobat durant la seva realització.

Per una banda, aquest estudi és el primer que permet apreciar com la inflamació sistèmica roman absent en els individus que no presenten una descompensació prèvia (compensats i sans) i també com la resposta inflamatòria desmesurada es desencadena en pacients descompensats sense ACLF i s'accentua a partir del desenvolupament de la síndrome. També es tracta de la primera vegada que s'analitza el patró d'inflamació associat a l'aparició de les complicacions orgàniques més freqüents en pacients cirròtics com són les insuficiències hepàtica i renal i les disfuncions renal i cerebral. Aquesta anàlisi manifesta com l'augment dels nivells de marcadors d'inflamació podria ser l'enllaç entre l'empitjorament de la cirrosi i el desencadenament de problemes orgànics. La present investigació proporciona un punt de vista innovador sobre el concepte d'ACLF, atès que relaciona el seu desenvolupament amb una reacció inflamatòria i no únicament a característiques clíniques generals com seria l'etiologia.

L'anàlisi dels nivells dels mediadors inflamatoris relacionats amb la cirrosi, posa en relleu la necessitat de comprendre millor el missatge que proporciona l'agrupació entre els marcadors. Per a aquest estudi no s'ha disposat dels coneixements necessaris per tal d'aportar una aplicació clínica a aquestes classificacions, com podria ser una teràpia enfocada a inhibir l'efecte dels marcadors que més es manifesten en pacients AD i ACLF i poder prevenir el desenvolupament de la síndrome. Per aquest motiu es vol seguir endavant amb l'estudi del patró d'inflamació dels individus cirròtics i poder trobar aplicacions a les conclusions extretes mitjançant aquest projecte, junt amb professionals en l'àmbit clínic.

D'altra banda, l'estudi de la mortalitat de la mostra d'individus descompensats amb i sense ACLF, ha permès aplicar tècniques d'anàlisi de supervivència com és el model de riscos competitius de Fine i Gray que no s'havia treballat prèviament. Tot i que s'han pogut extreure conclusions en relació a la mortalitat dels pacients descompensats amb i sense ACLF, s'ha detectat l'incompliment de la hipòtesi de riscos proporcionals necessària per tal d'utilitzar la regressió de Cox. Per al present projecte no s'ha disposat de temps per tal de dur a terme una anàlisi més detallada en aquest aspecte, però caldria treballar la possibilitat d'avaluar l'aplicació d'un model de Cox ampliat (depenent del temps) en presència de riscos competitius. A partir de l'estudi d'aquest model, també s'ha pogut apreciar la carència en la implementació d'una metodologia que permeti avaluar el supòsit de proporcionalitat de riscos entre diferents categories d'un factor. Així doncs, un dels projectes de cara al futur seria treballar en una possible metodologia adient per a dur a terme aquesta anàlisi.

No obstant, aquest estudi presenta algunes limitacions. Un dels principals problemes d'aquesta investigació és la dificultat de tractar amb variables com els marcadors d'inflamació, que tenen una enorme variabilitat. Com s'ha esmentat, cada marcador té un límit inferior de detecció de manera que els valors per sota d'aquest límit s'han fixat al valor indicat. Contràriament, els valors superiors es consideren vàlids en sentit clínic, de manera que els marcadors poden prendre valors en rangs molt amplis. Els valors superiors denoten una

resposta inflammatòria desmesurada i no serien els valors normals d'una persona sana, per la qual cosa els valors elevats són menys freqüents i això provoca distribucions molt asimètriques amb una cua molt llarga per la dreta. Aquestes distribucions són un problema per tal de poder extreure conclusions a partir de l'anàlisi d'aquestes variables de manera que s'han dut a terme transformacions logarítmiques per a solucionar aquesta asimetria i homogeneïtzar la variabilitat. Altrament, es podria haver treballat aquestes variables mitjançant l'eliminació del 5% dels valors superiors extrems però aquesta opció no s'ha considerat perquè els valors situats a la dreta aporten informació sobre els pacients en un estat més greu.

VI. REFERÈNCIES

- [1] Andersen P., Geskus R., de Witte T., Putter H. (2012). Competing risks in epidemiology: possibilities and pitfalls. *International Journal of Epidemiology*, 41 (3): 861–870.
- [2] Angeli P., Rodríguez E., Piano S., et al. (2016). Acute kidney injury and acute-on-chronic liver failure classifications in prognosis assessment of patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gut*, 64 (10): 1616-1622.
- [3] Arvaniti V., D'Amico G., Fede G., et al. (2010). Infections in Patients with Cirrhosis Increase Mortality Four-Fold and Should Be Used in Determining Prognosis. *Gastroenterology*, 139 (4): 1246-1256.
- [4] Austin P., Lee D., Fine J. (2016). Introduction to the Analysis of Survival Data in the Presence of Competing Risks. *Circulation*, 133 (6): 601-609.
- [5] Box G., Cox D. (1964). An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 26 (2): 211-252.
- [6] Clària J. (2016). Systemic Inflammation in Decompensated Cirrhosis: Characterization and Role in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Hepatology*, 65 (4): 1249-1264.
- [7] Cox D. (1972). Regression Models and Life Tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 34 (2): 187:220.
- [8] D'Amico G., Garcia-Tsao G., Pagliaro L. (2006). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of Hepatology*, 44 (1): 217-231.
- [9] De Pablo R., Montserrat J., Prieto A., Reyes E., Álvarez M., Sánchez M. (2005). The balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in septic states. *Med Intensiva*, 29 (3): 151-158.
- [10] Durand F. et al. (2005). Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *Journal of Hepatology*, 42(1): S100-S107.
- [11] Filella X., Molina R., Ballesta AM. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Med Intgr*, 39 (2): 63-71.
- [12] Fine J., Gray R. (1999). A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *Journal of the American Statistical Association*, 94(446): 496-509.
- [13] Fowlkes E., Mallows C. (2012). A Method for Comparing Two Hierarchical Clusterings. *Journal of the American Statistical Association*, 78 (383): 553-569.
- [14] Geskus R.B. (2011). Cause-Specific Cumulative Incidence Estimation and the Fine and Gray Model Under Both Left Truncation and Right Censoring. *Biometrics*, 67 (1): 39-49.
- [15] Gooley T., Leisenring W., Crowley J., Storer B. (1999) Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Statistics in Medicine*, 18 (6): 695–706.
- [16] Gray R. (1999) A Class of K-Sample Tests for Comparing the Cumulative Incidence of a Competing Risk. *The Annals of Statistics*, 16 (3): 1141-1154.
- [17] Gómez G., Cadarso-Suárez C. (2017). El modelo de riesgos proporcionales de Cox y sus extensiones. Impacto en Estadística y Biomedicina. *La Gaceta de la RSME*, 20 (3): 513:538.

- [18] Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou MCB., Rahu N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016 (10): 1-9.
- [19] Jalan R. (2014). Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute-on-chronic liver failure. *J hepatol*, 61(5): 1038-1047.
- [20] Kleinbaum, D. G. and Klein, M. (2012). *Survival Analysis: A Self-Learning Text*, Second Edition (Statistics for Biology and Health). Springer.
- [21] Marcio C., Kimiko R., TSA, Machado A., Gerola L., Salomão R. (2011). Cytokines and Pain. *Rev Bras Anesthesiol*, 61 (2): 255-265.
- [22] Moreau R. (2013). Acute-on-chronic Liver Failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of Cirrhosis. *Gastroenterology*, 144 (7): 1426-1437.
- [23] Moreau R., Arroyo V. (2015). Acute-on-Chronic Liver Failure: A New Clinical Entity. *Gastroenterology and Hepatology*, 13 (5): 836-841.
- [24] Noordzij M., Leffondré K., Van Stralen K., Zoccali C., Dekker F., Jager K. (2013) When do we need competing risks methods for survival analysis in nephrology? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28 (11): 2670–2677.
- [25] Pintilie M. (2002). Dealing with competing risks: testing covariates and calculating sample size. *Statistics in Medicine*, 21 (22): 3317-3324.
- [26] Pleil J., Stiegel M., Madden M., Sobus J. (2011). Heat map visualization of complex environmental and biomarker measurements. *Chemosphere*, 84 (5): 716-723.
- [27] Putter H., Fiocco M., Geskus R. B. (2007). Tutorial in biostatistics: Competing risks and multi-state models. *Statistics in Medicine*, 26(11): 2389-2430.
- [28] Putignano A., Gustot T. (2017). New Concepts in Acute-on-Chronic Liver Failure: Implications for Liver Transplantation. *Liver Transplantation*, 23 (2): 234-243.
- [29] Razali NM. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2 (1): 21-33.
- [30] Verduijn M., Grootendorst D., Dekker F., Jager K., le Cessie S. (2011). The analysis of competing events like cause-specific mortality—beware of the Kaplan-Meier method, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26 (1): 56–61.
- [31] Wiesner R, Edwards E, Freeman R, et al. (2003) Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*, 124 (1):91–96
- [32] Wehler M., Kokoska J., Reulbach U., et al. (2001). Short-term prognosis in critically ill patients with cirrhosis assessed by prognostic scoring systems. *Hepatology*, 34 (2): 255-261.
- [33] Wolbers M., Koller M., Wittman J., Steyerberg E. (2009). Prognostic models with competing risks methods and application to coronary risk prediction. *Epidemiology*, 20 (4): 555-561.
- [34] Zhenmin C., Van Ness J. (1998). Characterizations of nearest and farthest neighbor algorithms by clustering admissibility conditions. *Pattern Recognition*, 31 (10): 1573-1578.

VII. ANNEXOS

1. Annex 1: Normalitat de les variables.

Taula VII.1. Resultats del test de Shapiro-Wilk

Variable	Estadístic	P-valor	Variable	Estadístic	P-valor
Edat	0.99532	0.1024			
MAP	0.9924	0.008083	MCP-1	0.33091	< 2.2e-16
Albúmina	0.99201	0.01224	IP-10	0.66006	< 2.2e-16
Bilirubina	0.73272	< 2.2e-16	MIP-1β	0.60462	< 2.2e-16
Creatinina	0.72479	< 2.2e-16	G-CSF	0.13402	< 2.2e-16
CRP	0.69725	< 2.2e-16	GM-CSF	0.13698	< 2.2e-16
INR	0.79162	< 2.2e-16	IL-10	0.29286	< 2.2e-16
Plaquetes	0.8899	< 2.2e-16	IL-1RA	0.31384	< 2.2e-16
WBC	0.85237	< 2.2e-16	IFNγ	0.30174	< 2.2e-16
Sodi	0.96732	1.341e-09	Eotaxina	0.54167	< 2.2e-16
TNFα	0.62181	< 2.2e-16	IL-17A	0.49624	< 2.2e-16
IL-6	0.16688	< 2.2e-16	IL-7	0.40824	< 2.2e-16
IL-8	0.26301	< 2.2e-16	HNA2	0.91423	< 2.2e-16

2. Annex 2: Taules descriptives

Taula VII.2. Descriptiva de les característiques generals segons la mortalitat per un seguiment de 28 dies

Variable	Censurats (n=429)	Morts (n=57)	P
Característiques clíniques			
Edat ⁽¹⁾	57.08 +/- 11.84	59.07 +/- 8.98	0.136
Gènere (Home) ⁽²⁾	284/429 (66.20%)	35/57 (61.40%)	0.474
MAP (mmHg) ⁽³⁾	83.33 (73.33- 91.67)	83.67 (74.17- 90.00)	0.958
Etiologia de la cirrosi			
Alcohol ⁽²⁾	212/406 (52.22%)	30/53 (56.60%)	0.547
HCV ⁽²⁾	86/406 (21.18%)	15/53 (28.30%)	0.239
Alcohol+HCV ⁽²⁾	41/406 (10.10%)	2/53 (3.77%)	0.207
Altres ⁽²⁾	67/406 (16.50%)	6/53 (11.32%)	0.332
Dades de laboratori			
Albúmina (g/dL) ⁽³⁾	2.91 (2.50- 3.30)	2.65 (2.30- 3.15)	0.061
Bilirubina (mg/dL) ⁽³⁾	3.16 (1.60- 8.00)	6.20 (2.90- 16.68)	<0.001
Creatinina (mg/dL) ⁽³⁾	1.00 (0.73- 1.70)	1.40 (0.90- 2.54)	0.003
CRP (mg/dL) ⁽³⁾	20.00 (6.80- 41.40)	30.50 (17.65- 60.00)	0.016
INR ⁽³⁾	1.48 (1.29- 1.81)	1.87 (1.50- 2.20)	<0.001
Plaquetes (x10 ⁹ /L) ⁽³⁾	88.50 (57.00- 135.50)	74.00 (55.00- 115.00)	0.315
WBC (x10 ⁹ /L) ⁽³⁾	6.43 (4.34- 9.93)	9.00 (6.40- 13.90)	<0.001
Sodi (mmol/L) ⁽³⁾	136.00 (132.00- 139.00)	132.00 (127.00- 137.00)	<0.001
Variables classificatòries d'estudi			
Grup *			<0.001
AD ⁽²⁾	311/429 (93.39%)	22/57 (6.61%)	
ACLF ⁽²⁾	118/429 (77.12%)	35/57 (22.88%)	
Fallides orgàniques (AD) *			0.921
No OD-No OF ⁽²⁾	142/311 (92.81%)	11/22 (7.19%)	
RD-CD ⁽²⁾	110/311 (94.02%)	7/22 (5.98%)	
OF ⁽²⁾	59/311 (93.65%)	4/22 (6.35%)	
Fallides orgàniques (ACLF) *			0.034
LF ⁽²⁾	34/121 (94.44%)	2/29 (5.56%)	
RF ⁽²⁾	46/121 (82.14%)	10/29 (17.86%)	
LF+RD/CD ⁽²⁾	18/121 (66.67%)	9/29 (33.33%)	
RF+CD ⁽²⁾	23/121 (74.19%)	8/29 (25.81%)	

⁽¹⁾ Mitjana ± desviació típica

⁽²⁾ Freqüència absoluta (freqüència relativa)

⁽³⁾ Mediana (quartil1 – quartil3)

* Percentatges per fila.

MAP: Mean Arterial Pressure, HCV: Hepatitis C Virus, CRP: C-Reactive Protein, INR: International Normalized Ratio, WBC: White Blood Cells AD: Acute Decompensation, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure, OD: Organ Dysfunction, OF: Organ Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, LF: Liver Failure, RF: Renal Failure

Els pacients trasplantats (n=17) s'han exclòs d'aquesta anàlisi perquè es considerarà el trasplantament com un esdeveniment secundari a la mort.

Taula VII.3. Descriptiva dels nivells dels marcadors d'inflamació segons la mortalitat per un seguiment de 28 dies

Variable	Censurats (n=429)	Morts (n=57)	P
TNFα (pg/mL) ⁽¹⁾	21.36 (14.79-31.87)	29.77 (18.73-42.86)	0.0002
IL-6 (pg/mL) ⁽¹⁾	22.78 (10.35-46.43)	50.00 (22.43-172.86)	<.0001
IL-8 (pg/mL) ⁽¹⁾	46.46 (24.51-99.53)	103.62 (52.08-196.02)	<.0001
MCP-1 (pg/mL) ⁽¹⁾	345.43 (246.51-497.01)	396.68 (298.04-695.75)	0.0118
IP-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	990.02 (606.26-1785.00)	1165.00 (594.38-2111.00)	0.4264
MIP-1β (pg/mL) ⁽¹⁾	23.51 (14.30-36.27)	36.87 (18.55-52.40)	0.0067
G-CSF (pg/mL) ⁽¹⁾	23.29 (11.19-52.24)	33.46 (18.99-83.81)	0.0151
GM-CSF (pg/mL) ⁽¹⁾	5.14 (2.09-10.98)	7.29 (3.11-15.86)	0.0271
IL-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	3.38 (0.88-10.51)	9.93 (1.90-24.50)	0.0013
IL-1RA (pg/mL) ⁽¹⁾	12.82 (5.67-32.93)	26.06 (12.81-66.23)	0.0004
IFNγ (pg/mL) ⁽¹⁾	5.99 (2.06-19.62)	8.78 (3.20-25.32)	0.1453
Eotaxina (pg/mL) ⁽¹⁾	115.11 (82.78-158.65)	122.31 (81.80-192.66)	0.2903
IL-17A (pg/mL) ⁽¹⁾	3.50 (1.60-12.10)	5.80 (1.91-37.56)	0.0873
IL-7 (pg/mL) ⁽¹⁾	2.41 (0.79-8.11)	3.38 (1.76-12.99)	0.0291
HNA2 (%)⁽¹⁾	5.81 (2.96-10.99)	9.70 (5.83-13.22)	0.0002

⁽¹⁾ Mediana (quartil1 – quartil3)

Els pacients trasplantats (n=17) s'han exclòs d'aquesta anàlisi perquè es considerarà el trasplantament com un esdeveniment secundari a la mort.

Taula VII.4. Descriptiva de les característiques generals dels pacients segons la mortalitat per un seguiment de 180 dies

Variable	Censurats (n=291)	Morts (n=146)	P
Característiques clíniques			
Edat ⁽¹⁾	56.96 +/- 11.71	58.95 +/- 11.68	0.095
Gènere (Home) ⁽²⁾	189/291 (64.95%)	98/146 (67.12%)	0.652
MAP (mmHg) ⁽³⁾	83.33 (74.33- 92.00)	83.33 (75.00- 90.00)	0.211
Etiologia de la cirrosi			
Alcohol ⁽²⁾	151/276 (54.71%)	76/137 (55.47%)	0.883
HCV ⁽²⁾	50/276 (18.12%)	35/137 (25.55%)	0.079
Alcohol+HCV ⁽²⁾	26/276 (9.42%)	10/137 (7.30%)	0.472
Altres ⁽²⁾	49/276 (17.75%)	16/137 (11.68%)	0.111
Dades de laboratori			
Albúmina (g/dL) ⁽³⁾	2.96 (2.54- 3.30)	2.90 (2.40- 3.30)	0.152
Bilirubina (mg/dL) ⁽³⁾	2.58 (1.40- 6.00)	6.18 (2.43- 14.50)	<0.001
Creatinina (mg/dL) ⁽³⁾	0.90 (0.70- 1.50)	1.40 (0.87- 2.20)	<0.001
CRP (mg/dL) ⁽³⁾	16.35 (6.00- 38.70)	31.10 (15.50- 59.00)	<0.001
INR ⁽³⁾	1.43 (1.23- 1.70)	1.74 (1.44- 2.20)	<0.001
Plaquetes (x10 ⁹ /L) ⁽³⁾	95.00 (59.00- 147.00)	81.50 (57.60- 121.00)	0.066
WBC (x10 ⁹ /L) ⁽³⁾	6.41 (4.40- 9.70)	8.30 (5.80- 12.20)	<0.001
Sodi (mmol/L) ⁽³⁾	136.00 (133.00- 139.00)	133.00 (129.00- 137.00)	<0.001
Variables classificatòries d'estudi			
Grup *			<0.001
AD ⁽²⁾	229/291 (78.69%)	73/146 (50.00%)	
ACLF ⁽²⁾	62/291 (21.31%)	73/146 (50.00%)	
Fallides orgàniques (AD) *			0.259
No OD-No OF ⁽²⁾	116/229 (80.00%)	29/73 (20.00%)	
RD-CD ⁽²⁾	74/229 (72.55%)	28/73 (27.45%)	
OF ⁽²⁾	39/229 (70.91%)	16/73 (29.09%)	
Fallides orgàniques (ACLF) *			0.098
LF ⁽²⁾	19/61 (61.29%)	12/69 (38.71%)	
RF ⁽²⁾	23/61 (48.94%)	24/69 (51.06%)	
LF+RD/CD ⁽²⁾	7/61 (28.00%)	18/69 (72.00%)	
RF+CD ⁽²⁾	12/61 (44.44%)	15/69 (55.56%)	

⁽¹⁾ Mitjana ± desviació típica

⁽²⁾ Freqüència absoluta (freqüència relativa)

⁽³⁾ Mediana (quartil1 – quartil3)

* Percentatges per fila.

MAP: Mean Arterial Pressure, HCV: Hepatitis C Virus, CRP: C-Reactive Protein, INR: International Normalized Ratio, WBC: White Blood Cells AD: Acute Decompensation, ACLF: Acute-on-Chronic Liver Failure, OD: Organ Dysfunction, OF: Organ Failure, RD: Renal Dysfunction, CD: Cerebral Dysfunction, LF: Liver Failure, RF: Renal Failure

Els pacients trasplantats (n=66) s'han exclòs d'aquesta anàlisi perquè es considerarà el trasplantament com un esdeveniment secundari a la mort.

Taula VII.5. Descriptiva dels nivells dels marcadors d'inflamació segons la mortalitat per un seguiment de 180 dies

Variable	Censurats (n=291)	Morts (n=146)	P
TNFα (pg/mL) ⁽¹⁾	20.33 (14.14-30.18)	26.68 (17.23-39.22)	0.0002
IL-6 (pg/mL) ⁽¹⁾	20.41 (9.75-42.95)	33.20 (17.27-104.39)	<.0001
IL-8 (pg/mL) ⁽¹⁾	44.78 (23.27-102.27)	66.53 (37.53-145.00)	0.0001
MCP-1 (pg/mL) ⁽¹⁾	347.96 (246.51-497.01)	373.28 (268.77-583.16)	0.0650
IP-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	984.16 (603.42-1806.00)	1027.00 (612.38-1946.00)	0.9061
MIP-1β (pg/mL) ⁽¹⁾	23.37 (13.92-39.86)	26.47 (15.44-45.50)	0.0821
G-CSF (pg/mL) ⁽¹⁾	23.00 (11.70-56.39)	28.09 (14.77-54.02)	0.3108
GM-CSF (pg/mL) ⁽¹⁾	5.08 (2.02-10.23)	5.93 (2.30-14.40)	0.1312
IL-10 (pg/mL) ⁽¹⁾	2.98 (0.84-9.65)	5.41 (1.19-19.82)	0.0049
IL-1RA (pg/mL) ⁽¹⁾	11.88 (5.67-32.93)	17.59 (7.89-49.18)	0.0036
IFNγ (pg/mL) ⁽¹⁾	5.88 (2.01-20.05)	6.28 (2.48-21.30)	0.5153
Eotaxina (pg/mL) ⁽¹⁾	107.56 (77.17-152.08)	127.71 (89.36-177.03)	0.0101
IL-17A (pg/mL) ⁽¹⁾	3.64 (1.52-11.53)	3.87 (1.59-15.37)	0.2947
IL-7 (pg/mL) ⁽¹⁾	2.43 (0.81-7.42, 32.92, 180.51)	2.43 (0.85-11.01)	0.2537
HNA2 (%) ⁽¹⁾	4.59 (2.59-9.24)	8.62 (4.89-13.65)	<.0001

⁽¹⁾ Mediana (quartil1 – quartil3)

Els pacients trasplantats (n=66) s'han exclòs d'aquesta anàlisi perquè es considerarà el trasplantament com un esdeveniment secundari a la mort.

3. Annex 3: Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació

Figura VII.1. Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació segons el grup de pacient

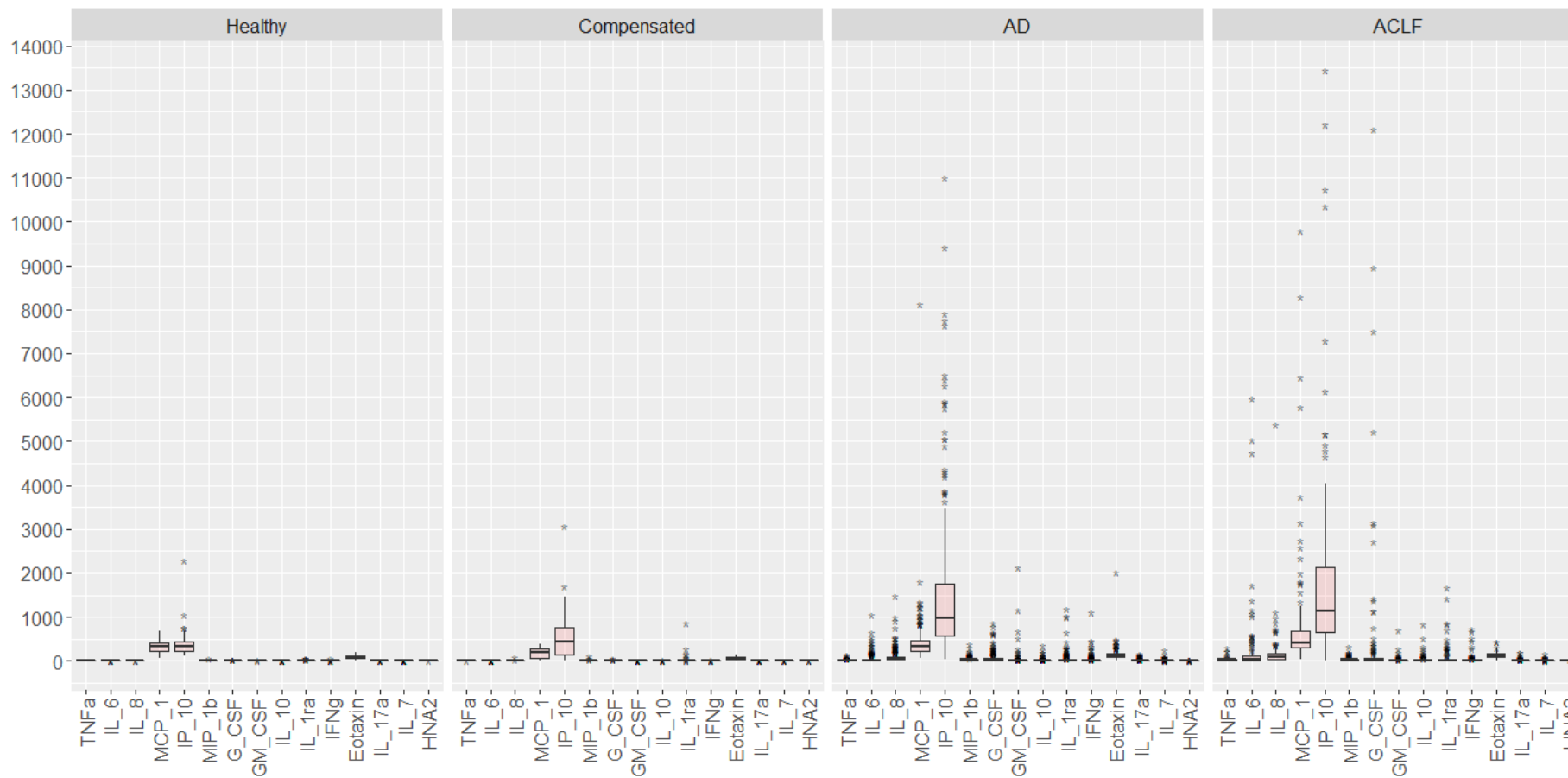
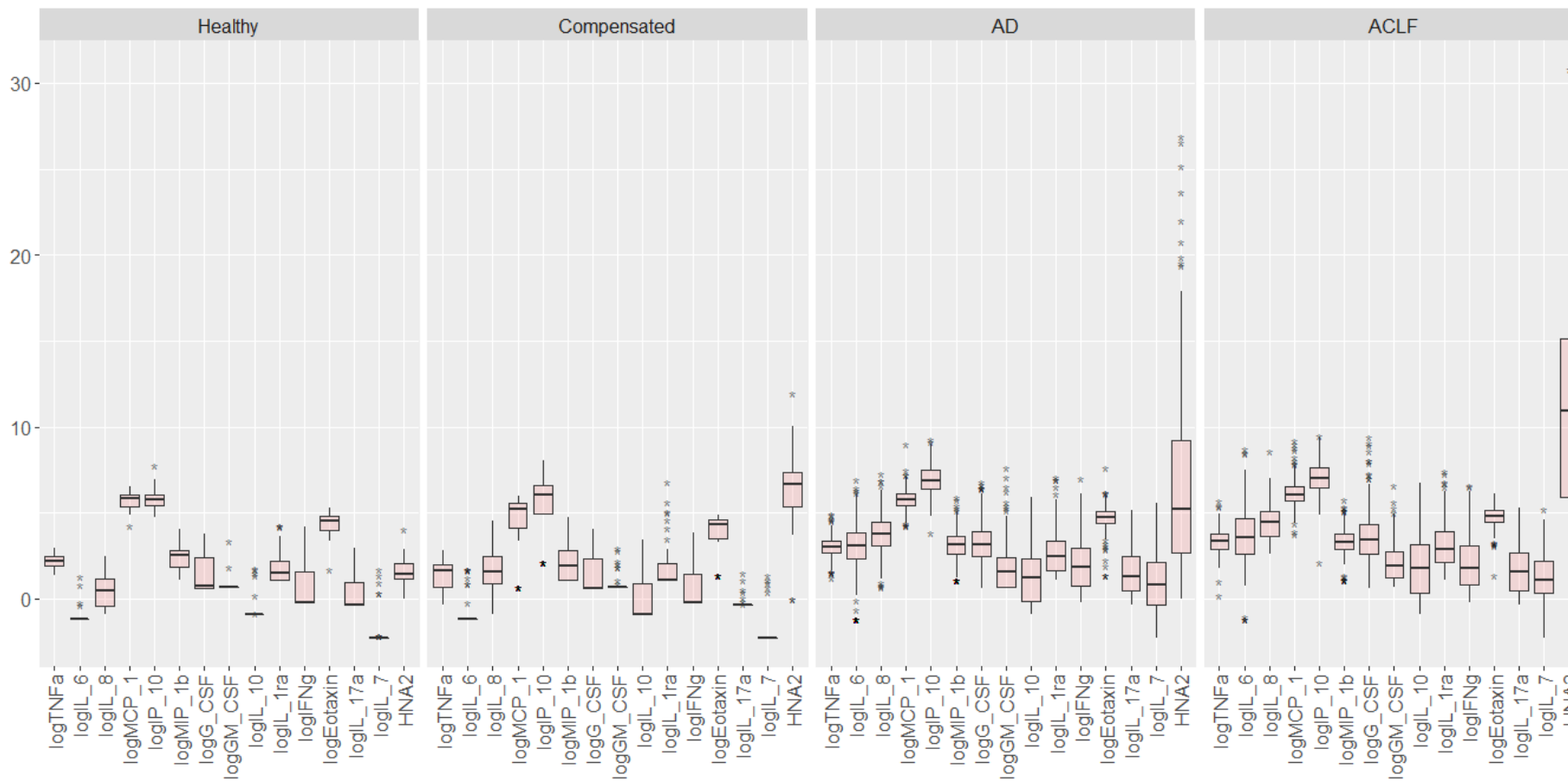


Figura VII.2. Diagrames de caixa dels marcadors d'inflamació aplicant logaritmes en funció del grup de pacient

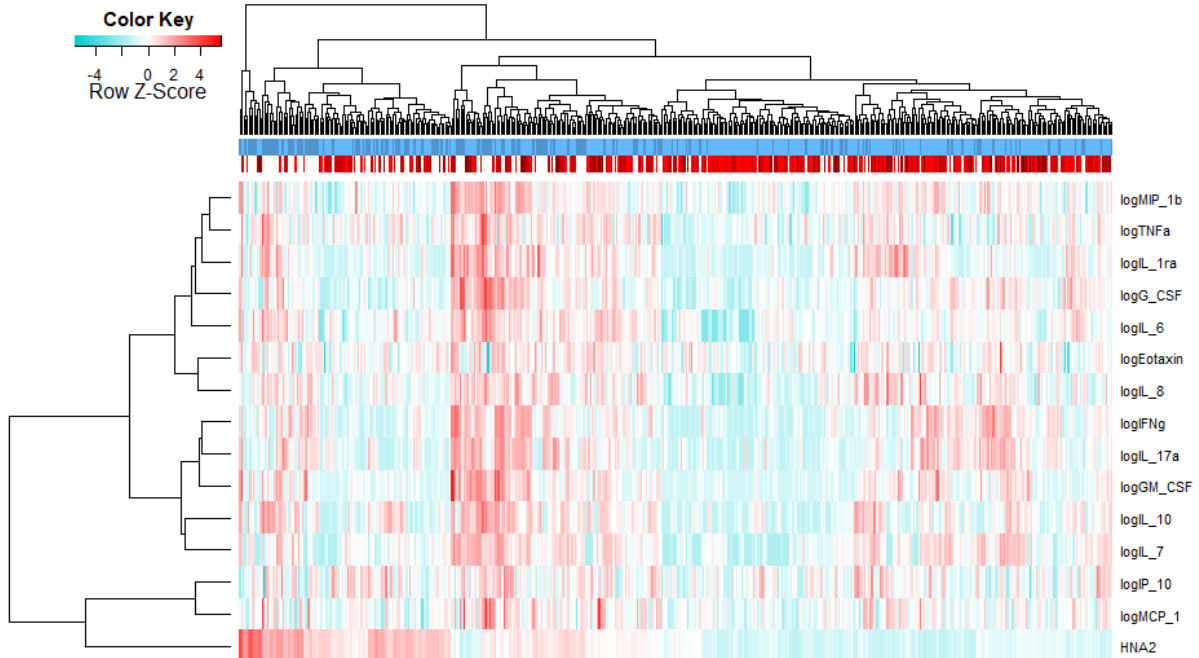


4. Annex 4: Anàlisi dels marcadors d'inflamació

Taula VII.6. Comparació de l'agrupació dels pacients predefinida i l'agrupació natural en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada i ACLF

Clústers	Acute Decompensation			ACLF
	No OF-No OD	RD-CD	OF	
1 (No OF-No OD)	113	61	40	46
2 (RD-CD)	25	32	17	47
3 (OF)	16	25	7	61
4 (ACLF)	1	3	2	7

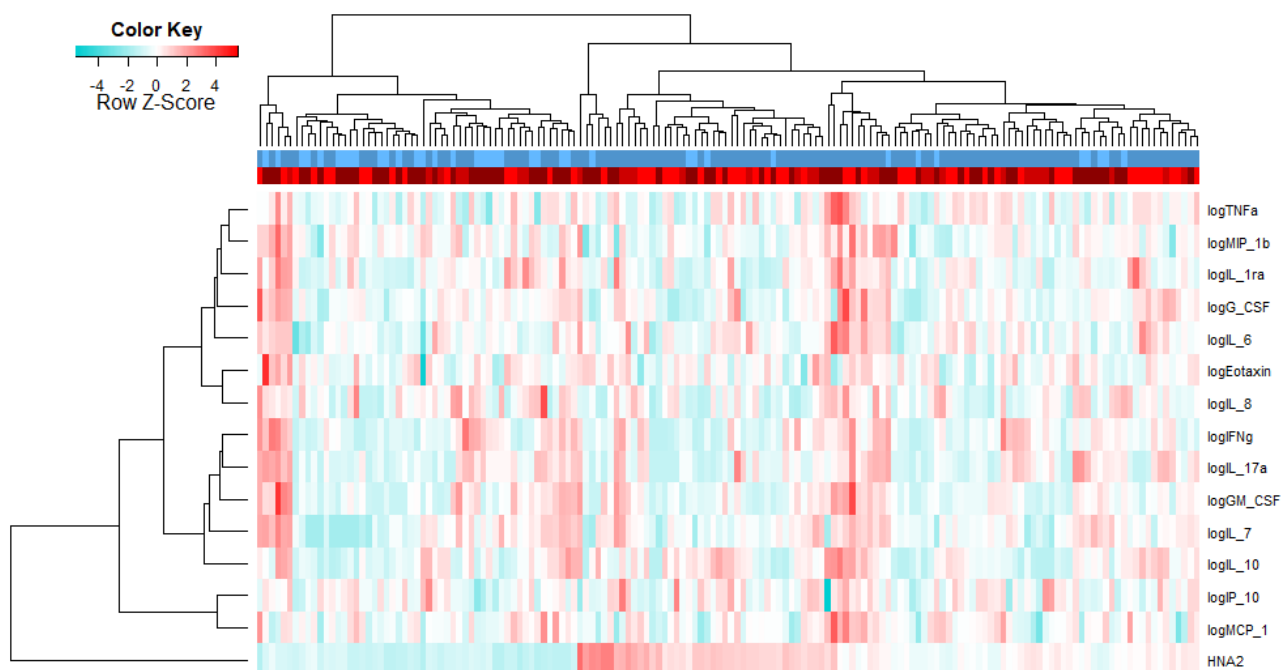
Figura VII.3. Representació dels valors individuals dels nivells dels marcadors d'inflamació amb clúster de pacients en funció de la presència de disfunció o insuficiència orgànica en individus amb cirrosi descompensada en comparació amb ACLF



Taula VII.7. Comparació de l'agrupació dels pacients predefinida i l'agrupació natural en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral

Clústers	Acute Decompensation		ACLF	
	Liver Failure	Renal Failure	Liver Failure + RD/CD	Renal Failure + CD
1 (Liver Failure)	25	15	7	6
2 (Renal Failure)	8	24	13	17
3 (Liver Failure + RD/CD)	4	16	8	7
4 (Renal Failure + CD)	1	1	1	3

Figura VII.4. Representació dels valors individuals dels nivells dels marcadors d'inflamació amb clúster de pacients en funció de la presència d'insuficiència hepàtica o renal i disfuncions renal i/o cerebral



5. Annex 5: Correlacions entre marcadors d'inflamació

Taula VII.8. Matriu de correlacions entre els marcadors d'inflamació

Marcadors	TNF α	IL-6	IL-8	MCP-1	IP-10	MIP-1 β	G-CSF	GM-CSF	IL-10	IL-1RA	IFN γ	Eotaxina	IL-17A	IL-7	HNA2
TNFα	1.00	0.53	0.20	0.44	0.27	0.48	0.42	0.32	0.70	0.50	0.13	0.14	0.19	0.27	0.19
IL-6	0.53	1.00	0.13	0.76	0.12	0.20	0.59	0.06	0.51	0.28	0.00	0.01	0.03	0.07	0.12
IL-8	0.20	0.13	1.00	0.27	0.06	0.13	0.17	0.03	0.11	0.08	0.06	0.08	0.13	0.09	-0.01
MCP-1	0.44	0.76	0.27	1.00	0.22	0.21	0.53	0.04	0.39	0.23	0.03	0.09	0.04	0.05	0.06
IP-10	0.27	0.12	0.06	0.22	1.00	0.13	0.16	0.02	0.17	0.09	0.05	0.12	0.07	0.12	0.09
MIP-1β	0.48	0.20	0.13	0.21	0.13	1.00	0.20	0.65	0.41	0.48	0.50	0.29	0.54	0.56	0.07
G-CSF	0.42	0.59	0.17	0.53	0.16	0.20	1.00	0.07	0.38	0.18	0.05	0.04	0.08	0.11	0.02
GM-CSF	0.32	0.06	0.03	0.04	0.02	0.65	0.07	1.00	0.19	0.47	0.39	0.23	0.35	0.46	0.04
IL-10	0.70	0.51	0.11	0.39	0.17	0.41	0.38	0.19	1.00	0.46	0.09	0.07	0.13	0.28	0.12
IL-1RA	0.50	0.28	0.08	0.23	0.09	0.48	0.18	0.47	0.46	1.00	0.19	0.10	0.19	0.31	0.05
IFNγ	0.13	0.00	0.06	0.03	0.05	0.50	0.05	0.39	0.09	0.19	1.00	0.20	0.57	0.44	0.00
Eotaxina	0.14	0.01	0.08	0.09	0.12	0.29	0.04	0.23	0.07	0.10	0.20	1.00	0.31	0.32	0.10
IL-17A	0.19	0.03	0.13	0.04	0.07	0.54	0.08	0.35	0.13	0.19	0.57	0.31	1.00	0.53	0.06
IL-7	0.27	0.07	0.09	0.05	0.12	0.56	0.11	0.46	0.28	0.31	0.44	0.32	0.53	1.00	0.02
HNA2	0.19	0.12	-0.01	0.06	0.09	0.07	0.02	0.04	0.12	0.05	0.00	0.10	0.06	0.02	1.00

