

Gastroenterología y Hepatología

www.elsevier.es/gastroenterologia



XXXV CONGRESO ANUAL DE LA FUNDACIÓN/ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

Genética y complicaciones de la cirrosis

L. Grande Santamaría*, E. Hoyas Pablos, J.A. del Campo, M. Jover, E. Suárez y M. Romero Gómez

Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Digestivas y CIBEREHD, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, España

Introducción

La investigación de las bases genéticas de las enfermedades humanas es un tema de gran actualidad en la medicina actual. En 1990, Watson et al iniciaron el proyecto del genoma humano, cuyo objetivo era descifrar su secuencia. A partir de este proyecto se publicó la secuencia completa¹.

En los últimos años se han descrito aproximadamente 1 millón y medio de mutaciones en el genoma humano. Dichas mutaciones se denominan polimorfismos genéticos. La forma más común de polimorfismo es la sustitución de un solo nucleótido que afecta a más de 1% de la población. Actualmente, se ha creado una base de datos pública de libre acceso en internet (<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) donde se han catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN². Estos polimorfismos pueden afectar la expresión o la composición de las proteínas que codifican y son considerados “funcionantes”. Un nivel adicional de variabilidad genética lo constituyen los haplotipos, los cuales están compuestos por un conjunto de SNP a lo largo del mismo cromosoma. Otro tipo de polimorfismo son los de secuencias repetidas, con una mayor aplicación en el diagnóstico genético y son conocidos como microsatélites; corresponden a la repetición en tándem de entre 2 y 5 nucleótidos.

La variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o resistencia individual a enfermedades, la progresión de éstas o la diferente respuesta terapéutica radica principalmente en los SNP³. Aunque el impacto de los estudios genéticos en la práctica clínica es todavía limitado, éstos podrían explicar por qué no todos los pacientes que presentan una hepatopatía crónica de similar etiología progresan a cirrosis hepática y a sus complicaciones. La ma-

yoría de las enfermedades hepáticas son tal vez debidas a la interacción de factores ambientales y genéticos. Las variaciones en genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo lipídico, en la respuesta inmune o en la fibrogenesis pueden explicar por qué ciertas personas adquieren enfermedad hepática o ésta progresa más rápidamente.

Genética y hemorragia digestiva por varices

La hipertensión portal (HTP) es responsable de las complicaciones más graves de la cirrosis, como son la hemorragia digestiva por varices, la ascitis, la disfunción renal y la encefalopatía hepática (EH). Los pacientes que nunca han presentado una complicación de la cirrosis se considera que se encuentran en una fase compensada, con una mortalidad entre el 1 y el 3,4%, mientras que el desarrollo de hemorragia por varices, ascitis o EH supone un paso a fase descompensada, con una mortalidad entre el 20 y el 57%.

En pacientes cirróticos, los cambios en la presión portal son proporcionales al incremento de la resistencia intrahepática y del flujo esplénico. El factor inicial es un incremento en la resistencia vascular intrahepática, mientras que el incremento en el flujo esplénico es un fenómeno secundario que mantiene o deteriora el ascenso de la presión portal y da lugar al estado hiperdinámico, que se caracteriza por aumento de la frecuencia cardíaca, gasto cardíaco y volumen plasmático. El incremento de la resistencia intrahepática es una consecuencia de 2 factores, uno no modificable por la fibrosis, que representa el 60-70%, y un componente modificable que representa el 30%, consistente en un desequilibrio en sustancias vasoactivas. En la cirrosis hay una sobreexpresión de vasoconstrictores local o sistémica, como son noradrenalina, endotelinas, angiotensina II y leucotrienos, que conducen a un incremento del tono vascular así como a una hiperrespuesta del lecho vascular a dichos mediadores. En contraste al exceso de vasoconstrictores, la

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lgrandes@medynet.com (L. Grande Santamaría)

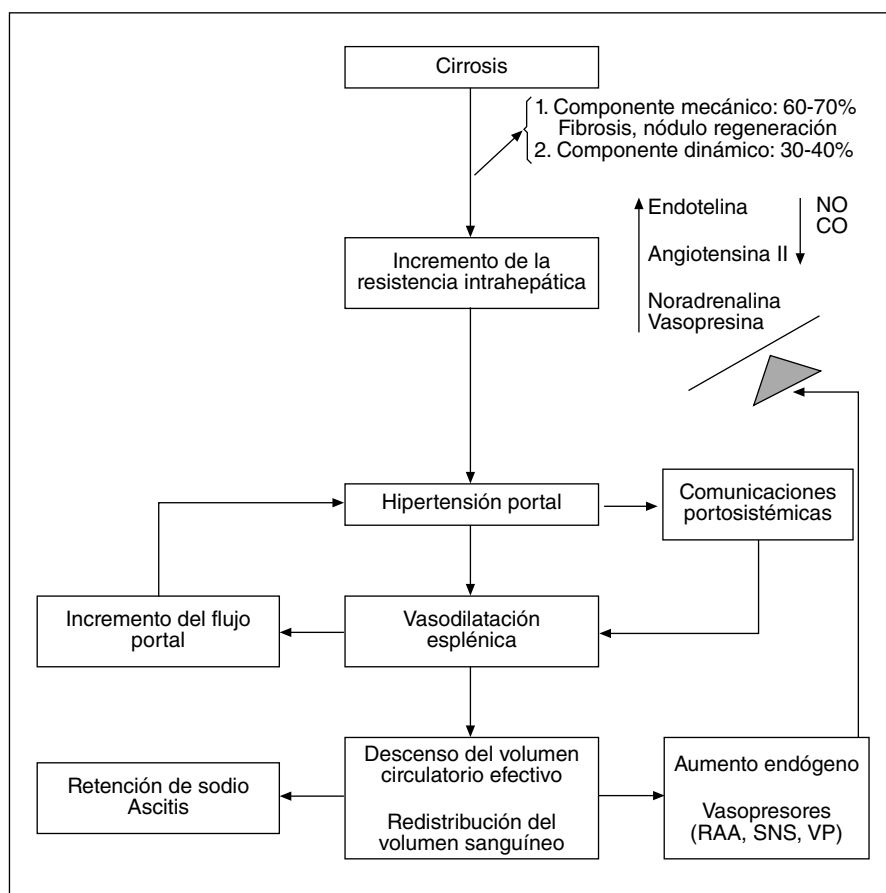


Figura 1 Fisiopatología de la hipertensión portal.

producción de vasodilatadores es insuficiente, donde el óxido nítrico (NO) es el mejor conocido y se incluyen otros como el monóxido de carbono⁴ (fig. 1).

El conocimiento de la fisiopatología de la HTP puede ayudar a la detección de polimorfismos en genes que regulan el sistema vascular y explicar la mayor susceptibilidad a desarrollar las complicaciones de la HTP, en concreto el desarrollo y hemorragia de las varices esofágicas (tabla 1).

En la historia natural de la HTP un gradiente de HTP > 10 mmHg da lugar al desarrollo de varices esofágicas y retención de sodio, progresando a varices dilatadas y aparición de ascitis. La incidencia anual de aparición de varices es del 8%, con una transición de varices pequeñas a grandes de un 12% anual y una incidencia de primera hemorragia en varices pequeñas de un 10% y de hasta el 30% en varices grandes⁵. Uno de los aspectos más llamativos de la historia natural de la hemorragia por varices es su marcada influencia pronóstica. La presencia de varices esofágicas condiciona un incremento en el estadio evolutivo en la historia natural de la cirrosis. A pesar de la mejoría en el pronóstico de la hemorragia por varices la mortalidad sigue siendo superior al 20%.

En la fisiología vascular de la HTP, el NO es una molécula vasoactiva que juega un papel en el mantenimiento del tono vascular de las colaterales, la administración de inhibidores del NO reducen la formación de colaterales portosistémicas sin reducir la presión portal, lo que sugiere un papel en su desarrollo⁶. Otras moléculas producen vaso-

constricción, como la angiotensina II, endotelina que reduciría la presión portal. Se han estudiado varios genes que codifican estas proteínas implicadas en el mantenimiento del tono vascular, como la NO sintetasa constitutiva (eNOS), el angiotensinógeno, la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) y el receptor tipo 1 de la angiotensina tipo II. Un polimorfismo en el gen de la ECA (I/D) influye en los valores de esta enzima, los homocigotos para el alelo D implica una mayor actividad en sangre comparado con el genotipo II⁷. Un polimorfismo consistente en 4-5 repeticiones de 27 pares de bases en el intrón 4 de eNOS se ha descrito asociado a mayores valores de NO en plasma en homocigotos 55⁸. Aunque está bien establecido que la aparición de varices esofágicas tiene lugar cuando el gradiente de la HTP es > 10 mmHg, el mecanismo preciso que controla el desarrollo de las varices y su ruptura no ha sido completamente dilucidado, hay pacientes con cirrosis que no la desarrollan. Variaciones genéticas de la ECA, en el angiotensinógeno, AT1R y eNOS podrían influenciar el tono vascular contribuyendo a la HTP. En un estudio donde se incluyó a 145 pacientes con cirrosis hepática alcohólica, se observó que los pacientes portadores del alelo I del gen de la ECA y homocigotos 55 en el gen de eNOS presentaban un riesgo mayor de desarrollar varices esofágicas (*odds ratio* [OR]: 3,19; intervalo de confianza [IC] del 95%, 1,55-6,55)⁹. Asimismo, la ascitis fue más frecuente entre los pacientes con varices, el 64 frente al 46% entre los sin varices. Los genotipos asociados con un mayor desarrollo de varices son

Tabla 1 Polimorfismos y complicaciones de la cirrosis hepática

Genes implicados	ACE-I/D	ecNOs-4/5	Receptor β -adrenérgico	CD14-159TT	Glutaminasa
Complicaciones de la cirrosis	Portadores del alelo I	Homocigotos ecNO55	Homocigotos Gly16-Gln/Glu27	Homocigotos CD14-159TT	Microsatélite 16XGCA
Desarrollo de varices esofágicas	Mayor riesgo	Mayor riesgo			
Ascitis				Mayor riesgo	
Encefalopatía hepática				Mayor riesgo	Mayor riesgo
Respuesta a tratamiento farmacológico			Mayor respuesta		

ECA: enzima de conversión de la angiotensina; ecNOS: enzima endotelial constitutiva óxido nítrico sintetasa.

aquellos con valores elevados de ecNOs y reducidos de ECA, Los genotipos asociados con un incremento de la vasodilatación podrían predisponer al desarrollo de varices esofágicas en pacientes con cirrosis hepática alcohólica.

En la profilaxis de la hemorragia por varices esofágicas la acción terapéutica ha sido directamente dirigida a disminuir la resistencia vascular intrahepática. Los bloqueadores betaadrenérgicos no selectivos se han establecido como terapia. El efecto beneficioso está relacionado con la capacidad para disminuir la presión portal. Produce un decremento del flujo portal secundario a la reducción del gasto cardíaco causado por el bloqueo β 1 adrenérgico y la vasoconstricción esplénica mediada por bloqueo β 2 adrenérgico. Una reducción del gradiente de HTP superior al 20% de la basal está asociada con una marcada reducción en el riesgo de sangrado¹⁰ y resangrado¹¹. Sin embargo, la respuesta a los bloqueadores beta es heterogéneo, con una tasa de no respuesta del 30-60%¹², influenciado por el grado de disfunción hepática, la dosis de bloqueadores beta y la extensión de las colaterales portosistémicas y varices.

La variación interindividual en la eficacia y efectos secundarios de la mediación puede estar influenciada por factores genéticos. Por esta razón, seleccionar el tratamiento farmacológico más apropiado para un individuo es un cambio clínico. Factores genéticos pueden influenciar la respuesta terapéutica a bloqueadores beta en pacientes con cirrosis hepática con HTP.

Se han identificado 4 polimorfismos del gen del receptor β 2 adrenérgico asociados con una expresión alterada, infra-regulación o alteración de la señal de transducción del receptor en respuesta a β 2 agonistas. Particularmente, 2 polimorfismos consistentes en la sustitución de glicina (Gly) por arginina (Arg) en la posición 16 y glutámico (Glu) por glutamina (Gln) en la posición 27, los haplotipos homocigotos para Gly16 y Glu27 o Gly16 y Gln27 (Gly16-Gln/Glu27) exhiben un incremento de la respuesta vasodilatadora¹³. En pacientes con cirrosis e HTP, el polimorfismo en el gen β 2 adrenérgico puede influenciar la respuesta vascular al propanolol, con una mayor respuesta a bloqueadores beta en los pacientes con el polimorfismo homocigoto Gly16-Gln/Glu27. Se incluyó a 48 pacientes con cirrosis y varices esofágicas, y se observó que pacientes con cirrosis y el haplotipo Gly16-Gln/Glu27 presentaban un mayor decremento en la frecuencia cardíaca ($-20,4 \pm 1,8\%$ frente a $-13,4 \pm 2,4\%$; $p = 0,025$) y en el índice cardíaco ($-27,2 \pm 2,6\%$ frente a

$-16,6 \pm 3,1\%$; $p = 0,02$) sin acompañarse de una reducción del gradiente de la HTP, probablemente secundario a un incremento de la resistencia sinusoidal hepática ($27,1 \pm 17,8\%$ frente a $-17,9 \pm 13,9\%$; $p = 0,042$) en los pacientes portadores del haplotipo Gly16-Gln/Glu27, debido a que el bloqueo β 2 adrenérgico podría estimular la actividad adrenérgica, actividad que incrementa el tono vascular hepático junto a una reducción de la enzima NO endotelial en la circulación con una mayor sensibilidad al NO. La implicación clínica de estos resultados sería seleccionar a un grupo de pacientes que se beneficiaría de la asociación de vasodilatadores, como el mononitrato de isosorbide, prazosin a propanolol o el uso de carvedilol, un fármaco bloqueador beta no cardioselectivo con actividad intrínseca anti- α 1 adrenérgica. Los polimorfismos influyen en la respuesta aguda hemodinámica y esplénica en respuesta al propanolol, pero no son capaces de predecir la reducción del gradiente de la HTP¹⁴.

Genética y ascitis

Estudios recientes han encontrado una asociación entre la hepatitis aguda alcohólica y los polimorfismos del gen que codifican citocinas proinflamatorias, como el TNF¹⁵, o citocinas antiinflamatorias, como la interleucina-10¹⁶. Jarve et al encontraron un polimorfismo en la región promotora del gen *CD14*(-159C/T), que se asoció a un mayor riesgo de hepatitis alcohólica; especialmente los homocigotos *CD14*(-159TT) mostraban un mayor riesgo a desarrollar cirrosis. La CD14 es una proteína de anclaje glucosilfosfatidil inositol, presente en la membrana de monocitos-macrófagos y células polimorfo celulares; asimismo, hay una forma circulante sCD14. La proteína actúa como ligando para lipopolisacáridos y otros productos bacterianos. Participan en la regulación del proceso inflamatorio. La proporción de pacientes con hepatitis alcohólica grave, definida como la presencia de EH o ascitis junto a una pobre función hepática, fue mayor en pacientes homocigotos para *CD14*(-159TT)¹⁷. Los pacientes homocigotos *CD14*(-159TT) podrían tener una mayor respuesta inflamatoria, como reflejó el incremento de los valores de lipopolisacáridos en estos pacientes y el incremento de la proteína circulante sCD14. El desarrollo de ascitis podría ser secundario a la implicación de la respuesta inflamatoria sistémica en la patogenia de la HTP y, por con-

secuencia, de la ascitis y EH. Los valores plasmáticos de las endotoxinas derivadas del intestino (lipopolisacáridos) están elevados en pacientes con cirrosis y contribuyen a la EH. Los lipopolisacáridos circulantes activan los macrófagos y producen TNF y otras citocinas proinflamatorias¹⁸. El estudio de polimorfismos en los genes de las proteínas proinflamatorias puede ayudar a seleccionar pacientes cirróticos con mayor riesgo de complicaciones y su implicación en la morbilidad del paciente.

Genética y encefalopatía hepática

La EH es una de las complicaciones mayores de la cirrosis hepática y se asocia a un pobre pronóstico¹⁹. La hiperamoniemia es un factor fundamental de la patogenia de la EH. Se han desarrollado nuevos conceptos en la producción de amonio. Durante la segunda mitad del siglo xx la hiperamoniemia se consideraba como producto de la descomposición de la urea por las bacterias intestinales y la mayoría de las dianas terapéuticas eran las bacterias del colon²⁰. No obstante, hay evidencias del papel del intestino en la producción de amonio: a) el desarrollo de hiperamoniemia y de encefalopatía en ratas sometidas a derivación portocava es similar en ratas en las que se eliminó la flora bacteriana con antibióticos que en ratas con flora preservada²¹; b) se ha demostrado un rápido aumento de amonio en sangre después de un aporte oral de Gln²²; c) en pacientes cirróticos con derivación portosistémica la producción de amonio en el intestino delgado constituye la mayor fuente para la hiperamoniemia sistémica y este amonio deriva básicamente del metabolismo de la Gln²³.

La glutaminasa activada por fosfato (PAG) cataliza la hidrólisis de la Gln para dar Glu, energía, síntesis de nucleótidos y amonio. En personas sanas, la mayor actividad PAG (80%) se encuentra en el intestino delgado (53 nmol glutamato min⁻¹ mg⁻¹ proteína) y una menor actividad (15%) en el intestino grueso (20 nmol glutamato min⁻¹ mg⁻¹ proteína)²⁴. La actividad PAG duodenal medida en biopsias procedentes de intestino delgado se encontró casi 4 veces elevada en pacientes cirróticos respecto a controles sanos²⁵ (fig. 2). Además, la actividad PAG está relacionada con la EH mínima, encontrándose mayor actividad en los pacientes con EHM y prueba de sobrecarga oral alterada.

La ordenación de todos estos datos ha permitido plantear una serie de modificaciones en la fisiopatología de la EH (fig. 3). En primer lugar, se postula que la principal fuente de amonio es el intestino delgado. Dado que la hiperamoniemia sistémica depende fundamentalmente de la producción intestinal de amonio y ésta, a su vez, deriva de la desaminación de la Gln, la glutaminasa intestinal sería la enzima reguladora de la producción de amonio y, por ende, de la hiperamoniemia sistémica. En condiciones normales, el hígado elimina el amonio a través del ciclo de la urea, pero en la cirrosis hepática, la detoxificación del amonio tiene lugar en el músculo a partir de la síntesis de Gln por la enzima glutaminasa sintetasa, de ahí el relevante papel del músculo y, por tanto, de la nutrición en el paciente cirrótico. Por último, la actividad glutaminasa está elevada en los astrocitos de ratas con derivación portocava; esta glutaminasa podría ser responsable de que el acúmulo de Gln en el astrocito actuase como un "caballo de Troya" y la

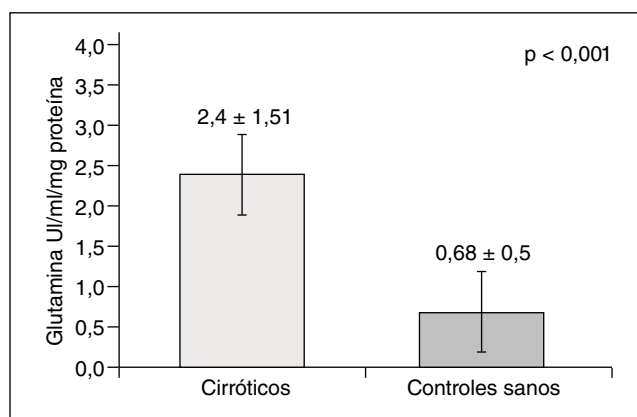


Figura 2 La actividad glutaminasa intestinal se encuentra elevada casi 4 veces en pacientes cirróticos respecto a controles sanos.

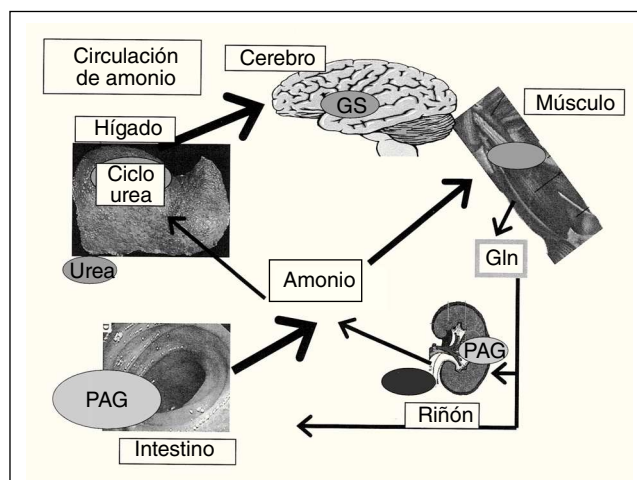


Figura 3 Producción, detoxificación y papel del amonio en la encefalopatía hepática. Gln: glutamina; GS: glutamin sintetasa; PAG: glutaminasa activada por fosfato.

glutaminasa perpetuaría la producción de amonio y la EH²⁶.

El abordaje de la vertiente genética de la EH surge de la necesidad de explicar por qué cirróticos con similar función hepática y el mismo tipo de complicaciones no desarrollan EH en igual proporción. También el hecho de que, aunque la EH mínima predispone a la aparición de EH clínica, no todos los cirróticos la desarrollan²⁷. Además, pacientes con el mismo grado de disfunción hepática y factores precipitantes pueden o no desarrollar EH. Dada la importancia de la glutaminasa intestinal en la nueva patogenia de la EH, se eligió como diana para un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo.

El gen de la glutaminasa (GLS) (número de acceso en OMIM: 138280) se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 en la región 2q32-q34. El ARNm original está constituido por 18 exones y 17 intrones; se han detectado al menos 2 polimorfismos en la región del promotor del GLS tipo renal en ratas, que inducen una funcionalidad enzimática en am-

bas direcciones²⁸. Actualmente, se incluyen 162 SNP del GLS en GenBank, de ellos 9 se encuentran en regiones codificantes del gen, y sólo 2 provocan cambios en aminoácidos. Se seleccionaron 4 polimorfismos que generaron 16 haplotipos, de los cuales sólo 6 de ellos superaron el 1% en frecuencia de población caucásica.

Se incluyó a 109 pacientes con cirrosis en la cohorte de estimación, 177 en la cohorte de validación y 107 controles sanos. Los pacientes fueron seguidos cada 3-6 meses hasta el desarrollo de EH, trasplante hepático, muerte o fin de seguimiento. El haplotipo TACC fue asociado con desarrollo de EH (OR: 0,34; IC del 95%, 0,09-0,13; $p = 0,03$) y la función hepática valorada por el MELD (OR: 0,57; IC del 95%, -0,29-1; $p = 0,03$). El haplotipo CACC también se asoció con la EH (OR: 0,22; IC del 95%, 0,005-0,089; $p = 0,002$), función hepática (OR: -1,68; IC del 95%, -3,05-0,3; $p = 0,01$) y la frecuencia crítica del parpadeo (OR: 0,36; IC del 95%, 0,14-0,97; $p = 0,04$). Por tanto, parece que la presencia de los haplotipos TACC y CACC protege frente al desarrollo de encefalopatía y el deterioro de la función hepática.

La secuenciación del gen, con la definición de las alteraciones genómicas y su relevancia funcional, podría permitir conocer mejor el impacto de las mutaciones del GLS en la patogenia de la EH. Para ello, se realizó un rastreo mutacional del GLS en un total de 20 individuos seleccionados, atendiendo a sus antecedentes haplotípicos y el riesgo de desarrollar EH. Se detectó un microsatélite localizado en la región 5'UTR del gen, definido como 16XGCA, se agruparon los alelos en relación con el número de repeticiones ($n < 14$ microsatélite corto y $n > 14$ microsatélite largo). Posteriormente, en la cohorte de pacientes de estimación ($n = 109$), con un período de seguimiento de $29,6 \pm 16$ meses, en el análisis multivariante de regresión de Cox, las 2 variables independientes de desarrollar EH fueron: el estadio de Child-pugh (*hazard ratio* [HR]: 4,3; IC del 95%, 1,6-11,4; $p = 0,03$) y el microsatélite largo (HR: 2,8; IC del 95%, 1,1-7,2; $p = 0,03$), datos que fueron confirmados en la cohorte de validación ($n = 177$), donde el 27% de los pacientes desarrolló EH en un período de seguimiento de $16,8 \pm 13$ meses. La presencia del microsatélite largo en la región del promotor del GLS se asoció a un incremento del riesgo de EH en el seguimiento (HR: 3,5; IC del 95%, 2,6-4,4; $p = 0,01$) (fig. 4).

Dado que esta variante se localiza en la región del promotor 5'UTR, se valoró si podría tener un papel funcional en los procesos de transcripción y/o traducción del GLS. Se realizó un análisis funcional mediante actividad luciferasa, observando una mayor actividad para el microsatélite largo (fig. 5).

Nuestro estudio genético supone una evidencia más del papel funcional de la glutaminasa en la patogenia de la EH, y proporciona un valor como marcador genético en la predicción del riesgo de desarrollar EH en pacientes con cirrosis hepática. Indica un microsatélite funcional en la región del promotor del GLS que se asocia a un riesgo elevado de desarrollar EH en pacientes cirróticos debido a un incremento en la actividad de la enzima en la variante larga del microsatélite.

En conclusión, en pacientes con cirrosis hepática el desarrollo de complicaciones no es universal y podría depender de la presencia de factores genéticos que regulasen en parte este riesgo. El conocimiento de la fisiopatología de la HTP es un paso fundamental para el estudio de polimorfismos de

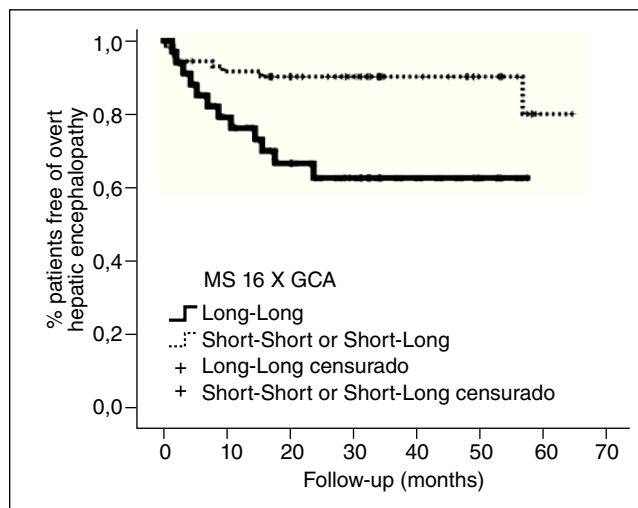


Figura 4 Curva actuarial que muestra los pacientes sin episodios de encefalopatía hepática respecto a la presencia del microsatélite del promotor del gen de la glutaminasa. Pacientes con un microsatélite largo muestran un mayor riesgo de desarrollar encefalopatía hepática ($\log\text{-rank}$: 7,74; $p < 0,01$).

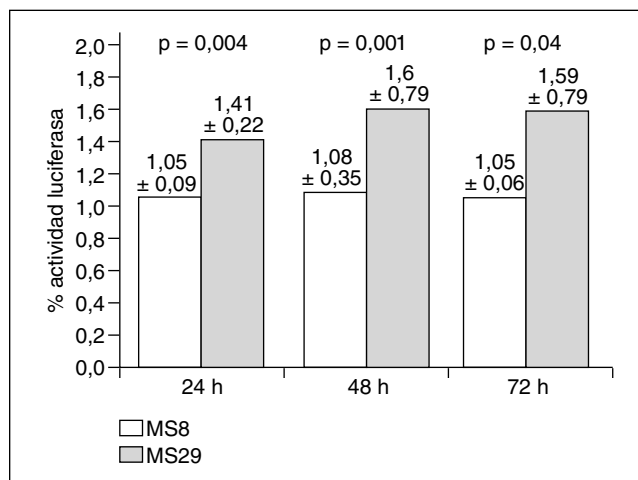


Figura 5 Actividad luciferasa medida a las 24, 48 y 72 h post-transfección. Representación de alelos cortos y largos (MS 8 y MS 29, respectivamente).

genes implicados en la codificación de proteínas relacionadas con el tono vascular, respuesta inmune o proinflamatoria.

En un futuro la genotipificación de los pacientes podría ser útil para predecir la evolución de una hepatopatía y elegir el tratamiento óptimo.

Bibliografía

1. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.

2. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:308-11.
3. Batailler R, North K. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical review. *Hepatology.* 2003;37:493-503.
4. Laleman W, Van Landeghem L, Wilmer A, Fevery J, Nevens F. Portal hypertension: from pathophysiology to clinical practice. *Liver International.* 2005;25:1079-90.
5. De Franks R. Evolving consensus in portal hypertension. Report of the Baveno IV consensus work shop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol.* 2005;43:167-76.
6. Lee F, Colombato L, Albillos A, Groszmann R. Administration of Nw-nitro L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in portal hypertensive rats. *Gastroenterology.* 1993;105:1464-70.
7. Rigat B, Hubert C, Alhenc Gelas F, et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990;86:1343-6.
8. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphisms with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:190-3.
9. Coto E, Rodrigo L, Álvarez R, Fuentes D, Rodríguez M, Menéndez L, et al. Variation at the angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase genes is associated with the risk of esophageal varices among patients with alcoholic cirrhosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38:833-9.
10. Escorsell A, Bordas JM, Casteneda B, Llach J, García Pagán JC, Rodes J, et al. Predictive value of the variceal pressure response to continued pharmacological therapy in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology.* 2003;31:101-67.
11. Abrahams JG, Tarantino I, Turnes J, García Pagán JC, Rodes J, Bosch J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long term prognosis of cirrhosis. *Hepatology.* 2003;37:902-8.
12. Bosch J, Mastai R, Kravetz D, Bruix J, Gaya J, Rigau J, et al. Effects of propranolol on azygos venous blood flow and hepatic and systemic hemodynamics in cirrhosis. *Hepatology.* 1984;4:1200-5.
13. Dishy V, Sofowora GG, Xie HG, Kim RB, Byrne DW, Stein CM, et al. The effect of common polymorphism of the beta 2 adrenergic receptor on agonist mediated vascular desensitization. *N Engl J Med.* 2001;345:1030-5.
14. Turnes J, Hernández Guerra M, Abrahams J, Bellot P, Oliva R, García Pagán JC, et al. Influence of beta 2 adrenergic receptor gene polymorphisms on the hemodynamic response to propranolol in patients with cirrhosis. *Hepatology.* 2006;43:34-41.
15. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Day CP. Association of tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 1997;26:143-6.
16. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. Interleukin 10 promoter region polymorphism and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut.* 2000;46:540-5.
17. Campos J, González Quintero A, Quinteiro C, Gude F, Pérez LF, Torre JA, et al. The -159C/T polymorphisms in the promoter region of the CD14 gene is associated with advanced liver disease and higher serum levels of acute phase proteins in heavy drinkers. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005;29:1206-13.
18. Lindros KO, Jauelane J. Chronic systemic endotoxin exposure: an animal model in experimental. *Metab Brain Dis.* 2005;20:393.
19. Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V, et al. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 1999;30:890.
20. Sherlock S. Chronic portal systemic encephalopathy: update 1987. *Gut.* 1987;28:1043-8.
21. Nance FC, Kline DG. Eck's fistula encephalopathy in germ free dog. *Ann Surg.* 1971;174:856-61.
22. Romero Gómez M, Grande L, Camacho I, Benítez S, Irlés JA, Castro M. Altered response to oral glutamine challenge as prognostic factor for overt episodes in patients with minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2002;35:871-7.
23. Olde Damink SW, Jalan R, Redhad DN, Hayes PC, Deutz NE, Soeters PB. Interrelation ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS. *Hepatology.* 2002;36:1163-71.
24. James LA, Lunn PG, Middleton S, Elia M. Distribution of glutaminase and glutamine synthase activities in the human gastrointestinal tract. *Clin Sci.* 1998;94:313-9.
25. Romero Gómez M, Ramos Guerrero R, Grande L, De Teran LC, Corpas R, Camacho I, et al. Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2004;41:49-54.
26. Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology.* 2006;44:788-94.
27. Romero Gómez M, Boza F, García Valdecasas MS, García E, Aguilar Reina J. Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:2718-23.
28. Taylor L, Liu X, Newsome W, Shapiro RA, Srivasan M, Curthoys NP. Isolation and characterization of the promoter region of the rat kidney type glutaminase gene. *Biochim Acta.* 2001;1518:132-6.