



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la respuesta inmune innata a
ligandos de TLR, infecciones bacterianas y tratamiento
con probióticos en la cirrosis**

AUTOR

Juan Camilo Nieto SÁCHICA

DIRECTOR

Silvia Vidal Alcorisa

**Programa de Doctorado en Inmunología
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
IIB Institut de Recerca Hospital de la Santa Creu I Sant Pau
Universitat Autònoma de Barcelona, 2015**

RESOLUCIÓ DE PRESENTACIÓ DE LA TESI COM A COMPENDI DE PUBLICACIONS

En la reunió del dia 22 de juliol de 2015 de la Comissió Acadèmica del Programa de Doctorat en Immunologia, d'acord amb la normativa Acadèmica de la Universitat Autònoma de Barcelona aplicable als Estudis universitaris regulats de conformitat amb el RD 1393/2007, de 29 d'octubre, modificat pel RD 861/2010, de 2 de juliol.

Ha resultat,

- Autoritzar
- No autoritzar

la presentació de la tesi del Sr. **Juan Camilo Nieto Sàchica** de títol *Caracterización de la respuesta innata a ligandos de TLR, infecciones bacterianas y tratamiento con probióticos en la cirrosis* en forma de compendi de publicacions a la Universitat Autònoma de Barcelona.



Universitat Autònoma de Barcelona


Departament de Biologia Cel·lular,
Fisiologia i Immunologia

Dolores Jaraquemada
Coordinadora del programa de
Doctorat en Immunologia

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), a 22 de juliol de 2015

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AIM-2	<i>Absent in melanoma-2</i>
AP-1	<i>Activation protein-1</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
ARN	Ácido ribonucleico
CD	Cluster de diferenciación
CLP	<i>Common lymphoid progenitors</i>
CLR	<i>C-type lectin receptor</i>
CMP	<i>Common myeloid progenitors</i>
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DTH	<i>Delayed-type hypersensitivity</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
IC	<i>Immune complexes</i>
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IKK	<i>IkB kinase</i>
IL	Interleucina
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinases</i>
IRF	<i>Interferon regulating factor</i>
ITAM	<i>Immuno receptor tyrosine-based activation motif</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	Lipopolisacarido
LRR	<i>Leucin rich region</i>
Mal	<i>MyD88 adaptor-like</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MPO	<i>Myeloperoxidase</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	Células Natural Killer
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBE	Peritonitis bacteriana espontanea
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PTX3	<i>The long pentraxin PTX3</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>

RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SBI	Sobrecrecimiento bacteriano intestinal
SER	Sistema retículo endotelial
SH2	Dominio SH2: homología Src2
SLAM	<i>signaling lymphocytic activation molecule</i>
SNP	<i>Single-nuclotide polymorphism</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TB	Translocación bacteriana
TGI	Tracto Gastrointestinal
TIR	<i>Toll/IL1 receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis alpha</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>Trif-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-related adaptor protein inducing interferon</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesión molecule</i>

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN/SUMMARY	3
<i>RESUMEN.....</i>	<i>5</i>
<i>SUMMARY.....</i>	<i>8</i>
2. INTRODUCCIÓN	12
<i>EL SISTEMA INMUNE INNATO Y SUS COMPONENTES CELULARES. GENERALIDADES.....</i>	<i>14</i>
Receptores de reconocimiento de patrones en la inmunidad innata.	15
Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).....	16
Principales familias de PRRs.	16
Receptores tipo Toll (TLR).....	17
Miembros de la familia TLR.....	18
Toll-like receptor 4	19
Vías de señalización de los TLRs.....	20
Polimorfismos en los genes PRR.....	21
Células de la respuesta inmune innata	23
Monocitos	23
Macrófagos	26
Neutrófilos.....	33
Citocinas producidas durante la señalización vía TLR en la respuesta innata	36
TNF- α	36
IL-10	38
IL-6.....	39
<i>RESPUESTA INNATA EN LAS INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA</i>	<i>41</i>
La Cirrosis. Definición.....	41
Cirrosis descompensada	42
Ascitis.	43
Peritonitis espontánea bacteriana (PBE).....	43
Translocación Bacteriana (TB).....	45
Alteraciones de la barrera intestinal.....	47
Relación entre la microbiota y la PBE: consecuencias de la TB.	52
Funciones de la microbiota	52
Probióticos. Generalidades.....	54
Microorganismos probióticos.....	56
Los probióticos sobre el tracto gastrointestinal.....	57
El VSL#3 en la cirrosis.	61
Modelos experimentales en la cirrosis.	61
Modelo de inducción de cirrosis por CCl ₄	62
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
<i>HIPÓTESIS.....</i>	<i>68</i>
<i>OBJETIVOS</i>	<i>69</i>
General.....	69
Específicos.....	69

4. PUBLICACIONES.....	71
5. SÍNTESIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	116
Artículo I.....	118
Síntesis de Resultados.....	118
Discusión y relevancia.....	120
Artículo II.....	122
Síntesis de Resultados.....	122
Discusión y relevancia.....	125
Artículo III.....	126
Síntesis de resultados.....	126
Discusión y relevancia.....	128
6. CONCLUSIONES.....	131
7. BIBLIOGRAFÍA.....	136

1. RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

La cirrosis ha sido definida como una etapa final de la enfermedad hepática, donde convergen diferentes fenómenos que afectan a la supervivencia de los individuos que la padecen. Dentro de estos fenómenos encontramos el paso de productos bacterianos al torrente sanguíneo, definido como translocación bacteriana patológica. Estos productos bacterianos al ser reconocidos por los *Toll-like receptors* de las células del sistema inmune, generan un estado pro-inflamatorio crónico. Este estado altera la respuesta inmune sistémica y predispone al desarrollo de infecciones bacterianas y complicaciones de la cirrosis, como la peritonitis bacteriana espontánea. Los probióticos pueden prevenir la translocación bacteriana patológica modulando la microbiota intestinal y mejorando la barrera intestinal. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales mejoran estas condiciones. El primer objetivo de este trabajo ha sido evaluar como el polimorfismo en los TLRs influye en el estado pro-inflamatorio crónico y en concreto en la respuesta inmune sistémica de los pacientes con cirrosis. El segundo objetivo ha sido caracterizar la respuesta inmune innata local en los líquidos ascíticos de los pacientes con cirrosis. Por último, se ha evaluado la influencia de los probióticos en el manejo de la cirrosis inducida con CCl₄ en un modelo experimental de rata.

A continuación se resumen los resultados de cada publicación.

Cytokine production in patients with cirrhosis and TLR4 polymorphisms.

Nieto JC, Sánchez E, Román E, Vidal S, Oliva L, Guarner-Argente C, Poca M, Torras X, Juárez C, Guarner C, Soriano G.

World Journal of Gastroenterology. 2014; 20(46): 17516-24.

Se analizó la producción de citocinas de las células de sangre periférica de pacientes con cirrosis con o sin el polimorfismo de TLR4 D299G y/o T399I. Los pacientes con alguno de los polimorfismos de TLR4 tuvieron una mayor incidencia de encefalopatía hepática previa que los pacientes *wild-type* (78% vs 20%, P = 0.02). La producción espontánea de IL-6 e IL-10 fue menor en los pacientes con polimorfismos de TLR4 que en los pacientes *wild-type* [IL-6: 888.7 (172.0-2119.3)

pg/mL vs. 5540.4 (1159.2-26053.9) pg/mL, $P < 0.001$; IL-10: 28.7 (6.5-177.1) pg/mL vs 117.8 (6.5-318.1) pg/mL, $P = 0.02$]. Sin embargo la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 después de la estimulación con LPS y LTA fue similar en los dos grupos. La presencia de alguno de los polimorfismos de TLR4 en los pacientes con cirrosis se asoció con un patrón distinto en la producción de citocinas, sugiriendo que los polimorfismos en TLR4 tienen un papel importante en el desarrollo de las complicaciones de la cirrosis.

Impaired innate immune response of leukocytes from ascitic fluid of patients with spontaneous bacterial peritonitis

Juan Camilo Nieto, Elisabet Sánchez, Cristina Romero, Eva Román, Maria Poca, Carlos Guarner, Cándido Juárez, Germán Soriano, Silvia Vidal.

Journal of Leukocyte Biology. Epub ahead of print August 7, 2015 - doi:10.1189/jlb.3AB0315-106R

Se analizó la respuesta inmune en el líquido ascítico de pacientes con cirrosis y ascitis que presentaban: ascitis estéril, PBE de cultivo positivo bacteriano ó PBE de cultivo negativo, antes y después del tratamiento con antibióticos. En el momento del diagnóstico, se observaron altos niveles de IL-6 e IL-10 en el líquido ascítico de los pacientes con PBE con cultivo positivo y PBE con cultivo negativo. Además había una correlación de los niveles de IL-6 con el porcentaje de neutrófilos ($R = 0.686$, $P = 0.001$). En este entorno, los neutrófilos de PBE con cultivo positivo y negativo tenían un estallido respiratorio deficiente, y, después del tratamiento solamente los neutrófilos de PBE con cultivo negativo recuperaron su función completa. Las altas concentraciones de IL-6 e IL-10 se correlacionaban con macrófagos de baja granularidad y niveles bajos de la expresión de CD14 ($R = -0.436$, $P = 0.005$ and $R = 0.414$, $P = 0.007$, respectivamente). Los macrófagos de pacientes con PBE con cultivo positivo expresaban niveles bajos de CD16, CD86, CD11b, CD206 y HLA-DR, sugiriendo una función global deficiente. El tratamiento con antibióticos incrementó todos los marcadores antigénicos analizados en los macrófagos de PBE con cultivo positivo. El tratamiento con antibióticos también aumentó la expresión de CD11b y CD86 en los macrófagos de PBE con cultivo

negativo. En estos macrófagos, el incremento estuvo acompañado por la recuperación de la función fagocítica. En resumen, los antibióticos revirtieron los niveles de expresión de los marcadores analizados en los macrófagos de PBE con cultivo positivo y negativo a niveles de los macrófagos de la ascitis estéril y restauraron la función de las células de PBE con cultivo negativo.

VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis

Elisabet Sánchez*, **Juan C. Nieto***, Ana Boullosa, Silvia Vidal, Francesc J. Sancho, Giacomo Rossi, Pau Sancho-Bru, Rosa Homs, Beatriz Mirelis, Caándido Juárez, Carlos Guarner, Germán Soriano.

Liver International. 2015 Mar;35(3):735-45.

*Los autores contribuyeron de igual manera en la publicación.

Se estudió como el tratamiento con VSL#3 modificaba la translocación bacteriana, la barrera intestinal y la respuesta inmune en el modelo experimental de rata con cirrosis inducida con CCl₄. La mortalidad fue similar en el grupo de ratas que habían tomado VSL#3 (10/22, 45%) y el grupo que solo había bebido agua (10/24, 42%). La incidencia de translocación bacteriana fue de 1/12 (8%) en el grupo VSL#3, 7/14 (50%) en el grupo que solo bebía agua (P=0.03 grupo agua vs. grupo VSL#3) y 0/11 (0%) en el grupo control (no cirrosis) (P=0.008 grupo control vs. grupo agua). La concentración de enterobacterias y enterococos ileal y cecal fue similar en los dos grupos de ratas con cirrosis. La concentración de ocludina fue mayor y los niveles de malondialdehído y TNF- α en el suero fueron menores en el grupo VSL#3 comparado con el grupo que solo bebió agua (P<0.05). En resumen, el VSL#3 disminuye la translocación bacteriana, el estado pro-inflamatorio y el daño oxidativo ileal, además incrementa la expresión de ocludinas en el modelo experimental de ratas con cirrosis.

SUMMARY

Cirrhosis has been defined as end-stage of liver disease that invariably leads to death. Liver damage can originate pathological bacterial translocation and the passage of bacteria and/or bacterial products to blood flow. Bacterial products can be recognized by immune cells with TLRs and subsequently develop a chronic pro-inflammatory state. This state alter immune responses predispose to bacterial infections and frequent complications such as spontaneous bacterial peritonitis (SBP). Probiotics can prevent pathological bacterial translocation by modulating intestinal microbiota, improving intestinal barrier and immune disturbances. However, mechanisms involved in better responses in cirrhosis are still unknown. The first objective of this study was to analyze how TLR polymorphisms influence the chronic pro-inflammatory state and specifically in the systemic immune response of patients with cirrhosis. The second objective was to characterize the local innate immune response in ascitic fluid of patients with cirrhosis. Finally, we evaluated the influence of probiotics in the management of cirrhosis induced in an experimental model rats with CCl₄.

We summarize the results of each publication in the next paragraphs.

Cytokine production in patients with cirrhosis and TLR4 polymorphisms.

Nieto JC, Sánchez E, Román E, Vidal S, Oliva L, Guarner- Argente C, Poca M, Torras X, Juárez C, Guarner C, Soriano G.

World Journal of Gastroenterology. 2014; 20(46): 17516-24.

We analyze the cytokine production by peripheral blood cells from cirrhotic patients with and without TLR4 D299G and/or T399I polymorphisms. Patients with TLR4 polymorphisms had a higher incidence of previous hepatic encephalopathy than wild-type patients (78% vs. 20%, $P = 0.02$). Spontaneous production of interleukin (IL)-6 and IL-10 was lower in patients with TLR4 polymorphisms than in wild-type patients [IL-6: 888.7 (172.0-2119.3) pg/mL vs. 5540.4 (1159.2-26053.9) pg/mL, $P < 0.001$; IL-10: 28.7 (6.5-177.1) pg/mL vs. 117.8 (6.5-318.1) pg/mL, $P = 0.02$]. However, the production of tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-10 after LPS and LTA stimulation was similar in the two groups. TLR4 polymorphisms were associated

with a distinctive pattern of cytokine production in cirrhotic patients, suggesting that they play a role in the development of cirrhosis complications.

Impaired innate immune response of leukocytes from ascitic fluid of patients with spontaneous bacterial peritonitis

Juan Camilo Nieto, Elisabet Sánchez, Cristina Romero, Eva Román, Maria Poca, Carlos Guarner, Cándido Juárez, Germán Soriano, Silvia Vidal.

Journal of Leukocyte Biology. Epub ahead of print August 7, 2015 - doi:10.1189/jlb.3AB0315-106R

Immune response was analyzed in patients with cirrhosis and ascities with sterile ascites, bacterial positive culture SBP or negative culture SBP before and after antibiotic treatment. At diagnosis, a high concentration of IL-6 and IL-10 was found in the ascitic fluid from negative and positive bacteriological culture. The IL-6 concentration correlated with the percentage of neutrophils ($R = 0.686$, $P = 0.001$). In this context, positive and negative culture neutrophils had an impaired oxidative burst, and, after the antibiotic, the negative culture spontaneous bacterial peritonitis burst was fully recovered. Higher concentrations of IL-6 and IL-10 correlated with the presence of low granular CD14^{low} macrophages ($R = -0.436$, $P = 0.005$ and $R = 0.414$, $P = 0.007$, respectively). Positive culture spontaneous bacterial peritonitis macrophages expressed the lowest levels of CD16, CD86, CD11b, and CD206, and HLA-DR, suggesting an impaired global function. Treatment increased all markers on the positive culture macrophages and CD11b and CD86 on negative culture macrophages. In negative culture spontaneous bacterial peritonitis, this increase was accompanied by phagocytic function recovery. The antibiotics then reverted the marker levels on positive and negative culture macrophages to the levels on sterile ascitis macrophages and restored ascitic negative culture cell function.

VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis

Elisabet Sánchez*, **Juan C. Nieto***, Ana Boullosa, Silvia Vidal, Francesc J. Sancho, Giacomo Rossi, Pau Sancho-Bru, Rosa Homs, Beatriz Mirelis, Caándido Juárez, Carlos Guarner, Germán Soriano.

Liver International 2014

*Both authors contributed equally to the study.

Bacterial translocation, Intestinal barrier and immune response were assessed in rats with CCl₄ induced cirrhosis. Mortality during this study was similar in the VSL#3 group (10/22, 45%) and the water group (10/24, 42%). The incidence of bacterial translocation was 1/12 (8%) in the VSL#3 group, 7/14 (50%) in the water group (P = 0.03 vs. VSL#3 group) and 0/11 in the control group (P = 0.008 vs. water group). The concentration of ileal and caecal enterobacteria and enterococci was similar in the two groups of cirrhotic rats. The ileal occludin concentration was higher and ileal malondialdehyde and serum levels of TNF- α were lower in the VSL#3 group than in the water group (P < 0.05). VSL#3 decreases bacterial translocation, the pro-inflammatory state and ileal oxidative damage and increases ileal occludin expression in rats with experimental cirrhosis.

2. INTRODUCCIÓN

EL SISTEMA INMUNE INNATO Y SUS COMPONENTES CELULARES. GENERALIDADES

La función esencial del sistema inmune es proteger al huésped contra agentes infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente. Para esto cuenta con dos tipos de defensa: innata y adaptativa (1). El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa que sirve para limitar la infección en el momento más temprano después de la exposición a diferentes patógenos (2). Este sistema de defensa incluye componentes celulares entre los que se encuentran células epiteliales, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células NK, además, de componentes del sistema del complemento, una gran variedad de citoquinas y moléculas solubles. Las células del sistema inmune innato pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* PAMPs) y señales endógenas asociadas al daño tisular (*Damage associated molecular patterns* DAMPs). El sistema inmune innato es capaz de responder frente a este tipo de señales de peligro y daño tras ser detectadas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (3).

El sistema innato se complementa con la respuesta a través del sistema inmune adaptativo que genera respuestas antígeno-específicas y confiere memoria inmunológica tras el primer contacto con el antígeno. La respuesta inmune adaptativa está mediada por componentes celulares, los linfocitos T y B, y componentes de tipo humoral, como es la respuesta mediada por anticuerpos. Las células presentadoras de antígeno (APC), y en especial células dendríticas y macrófagos, juegan un papel fundamental en la conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, ya que son las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T en el contexto de moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) presentes en su superficie (4). En consecuencia, el sistema inmune innato además de tener como función el reconocimiento de patógenos, estimula y polariza la respuesta inmune adaptativa con objeto de optimizar la eliminación del patógeno y minimizar los daños tisulares colaterales (5).

El sistema inmunitario de los vertebrados superiores está compuesto por gran variedad de células funcionalmente diferentes que derivan de células madre hematopoyéticas (*haematopoietic stem cells* HSC) y que además están en constante renovación (6). Las HSC se renuevan a sí mismas y dan lugar a células progenitoras linfoides (del inglés *common lymphoid progenitors* CLP), además de a células progenitoras mieloides (del inglés *common myeloid progenitors* CMP) con un potencial más limitado y que dan origen a granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos (7)

Receptores de reconocimiento de patrones en la inmunidad innata.

A diferencia de los receptores antigénicos generados por las células linfocitarias del sistema inmune adaptativo, los PRRs son receptores no clonales, codificados en la línea germinal, e independientes de la memoria inmunológica (8, 9). A pesar de la limitación que supone el hecho de que su especificidad esté determinada genéticamente, los PRRs pueden identificar componentes de origen exclusivamente microbiano, denominados PAMPs, favoreciendo la generación de una respuesta inmunológica rápida y oportuna. Además, se ha demostrado que los PRRs son capaces de reconocer componentes moleculares derivados del daño tisular originado por la infección, denominados DAMPs (10).

Los PRRs se expresan preferentemente en la membrana celular externa, vesículas endocíticas y el citoplasma de una amplia variedad de células particularmente monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T y células NK (11). No obstante, también se ha detectado su expresión en algunas células como fibroblastos y células de la superficie epitelial (8, 12). El panel de PRRs puede variar entre las diferentes células inmunes, resultando en una amplia variedad de posibilidades para cada tipo de celular. Además de que los diferentes PRRs reaccionan con PAMPs concretos, muestran patrones de expresión diferenciados, activan vías de señalización específicas y desencadenan distintas respuestas frente a los patógenos, también pueden interactuar formando redes multimoleculares complejas que potencian su función de reconocimiento (13).

Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

Debido a su implicación en funciones esenciales para la supervivencia y capacidad patogénica de los microorganismos (9), la invariabilidad es una de las principales características de los PAMPs y facilita la detección de cualquier agente patógeno mediante un limitado número de PRRs. Entre los principales PAMPs conocidos, se encuentran los ácidos nucleicos microbianos, incluyendo motivos CpG no metilados, ARN de doble cadena, ARN de cadena simple, y ARN 5'-trifosfato, así como lipoproteínas, glicoproteínas de superficie, flagelina y algunos componentes de la membrana como peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipopolisacárido, manano y glicosilfosfatidilinositol (11, 14)(15). Cuando un PRR detecta su correspondiente PAMP, se desencadena una cascada de señalización intracelular que desemboca en una respuesta inflamatoria caracterizada por fagocitosis, opsonización y producción de mediadores de la inflamación, entre los que se encuentran algunos péptidos antimicrobianos, citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, e interferones del tipo I (IFN) (16). Además, la respuesta mediada por PRR establece una conexión entre la inmunidad innata y adquirida (17).

Principales familias de PRRs.

Entre las principales familias de PRRs descubiertas hasta la fecha, se encuentran los Receptores Lectina Tipo C (CLR), encargados del reconocimiento, captación e internalización por vía endocítica de carbohidratos complejos presentes en bacterias, virus y hongos; los Receptores Tipo AIM-2 (*Absent In Melanoma 2*) cuya función radica en la identificación de ADN viral (18); los Receptores Tipo RIG-I (RLR), implicados básicamente en el reconocimiento de ácidos nucleicos virales (19); los Receptores Tipo NOD (NLR), que se encargan del reconocimiento de componentes microbianos intracelulares, y los Receptores Tipo Toll (TLR), siendo esta última familia la primera en ser descubierta y la más estudiada en la actualidad (Figura 1).

Receptores tipo Toll (TLR).

Los TLRs son glicoproteínas transmembranarias de tipo 1, localizadas tanto a nivel extracelular (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10, 11) como intracelular (TLR3, 7–9) a nivel de retículo endoplásmico y en compartimentos endosomales–lisosomales (20). Estructuralmente, los TLRs se caracterizan por la presencia de un dominio extracelular (DEC), seguido por una hélice transmembrana simple y un dominio intracelular TIR, similar al de los receptores de IL-1 (21). El DEC, esencial para el reconocimiento de patrones moleculares, contiene múltiples bloques de Repeticiones Ricas en Leucina (LRR) plegados en forma de herradura y protegidos por regiones ricas en cisteína que forman una capucha en los extremos N y C-terminales (14). Se han identificado ligandos naturales específicos para los diferentes TLRs que se enumeran en la (Tabla 1) (22). Una de las características

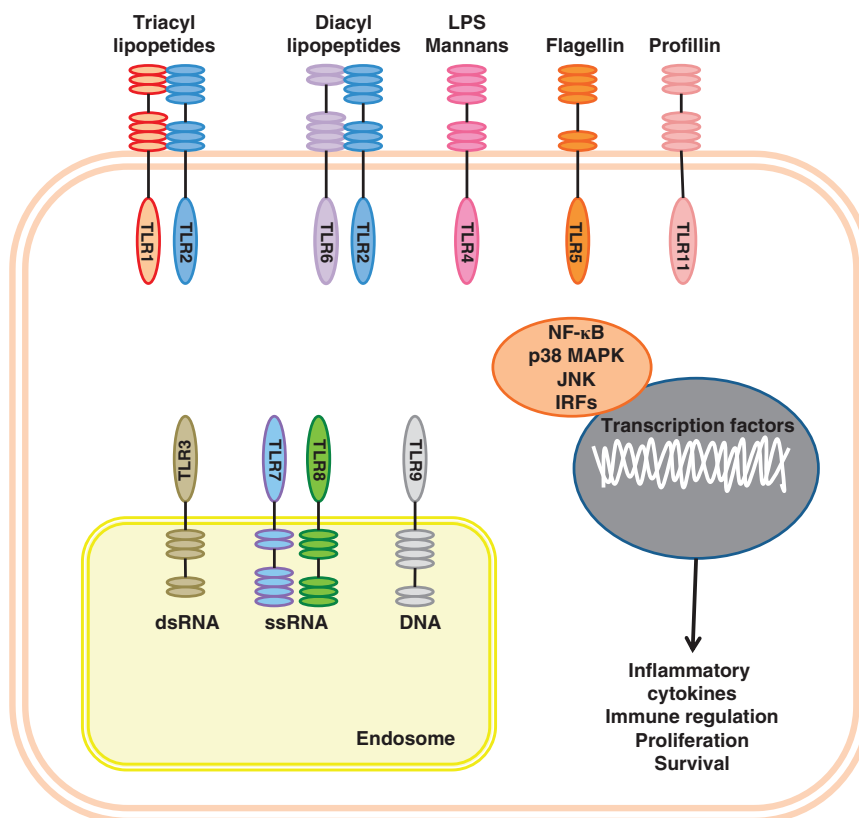


Figura 1. TLRs y sus principales ligandos. Se han identificado en humanos 11 tipos de TLRs que comparten características estructurales. Los TLRs constituyen una familia de proteínas transmembrana que reconocen un amplio espectro de PAMPs. Esta habilidad, permite al huésped detectar la presencia de patógenos e iniciar la respuesta inmune evitando la diseminación de la infección. Esta respuesta origina una cascada de señalización, fosforilando proteínas citoplasmáticas que activan factores de transcripción generando la respuesta inflamatoria. *Trejo de la O. Genes and Immunity 2014.*

más sobresalientes del reconocimiento mediado por TLR, es la capacidad que tienen algunos de ellos, principalmente el TLR2, para detectar una gran variedad de ligandos microbianos que no presentan nada en común en términos de estructura (1). Se ha confirmado la expresión de TLRs en una gran variedad de tipos celulares, tanto inmunitarios: monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T gamma/delta, como no inmunitarios: fibroblastos, miocitos cardiacos, células del endotelio vascular y células epiteliales (23)(9).

Existen 11 miembros en la familia TLR en humanos. (20, 24). TLR1, TLR6 y TLR10 presentan la misma localización cromosómica que TLR2, formando una subfamilia teóricamente generada a partir de la duplicación de un mismo gen ancestral. Esta circunstancia podría ser la razón por la cual TLR1, TLR6 y TLR10 pueden interactuar y formar heterodímeros de reconocimiento de PAMPs con el TLR2 (25).

Tabla 1. Ligandos de TLRs. Modificado de *Abdullah Z. EMBO J 2014* .

TLR	Ligando	Tipo de ligando
TLR1	Lipoproteínas triacetiladas/ forma complejos con TLR2	
TLR2	Lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, péptidoglicanos de bacterias Gram positivas y ácido lipoteicoico	Exógeno
	HMGB1, ácido hialurónico, proteínas de choque térmico	Endógeno
TLR3	ARN de doble cadena	Exógeno y endógeno
TLR4	Lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, péptidoglicanos de bacterias Gram negativas	Exógeno
	Ácido hialurónico, proteínas de choque térmico, ácidos grasos libres, sulfato de heparina	Endógeno
TLR5	Flagelina	Exógeno
TLR6	Lipoproteínas diacetiladas/ forma complejos con TLR2	
TLR7	ARN de cadena sencilla	Exógeno y endógeno
TLR8	ARN de cadena sencilla	Exógeno y endógeno
TLR9	Ácido desoxirribonucleico (ADN) no-metilado	Exógeno
	HMGB1	Endógeno
TLR10	Desconocido	

Miembros de la familia TLR

Por otro lado, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 están estrechamente relacionados debido a su ubicación intracelular y a su capacidad para reconocer ácidos nucleicos de

origen microbiano. TLR7 y TLR8 reconocen los mismos ligandos, se localizan en compartimentos del retículo endoplásmico y requieren de la maduración endosomal/lisosomal para su activación. La diferencia entre TLR7 y TLR8 radica en que TLR7 se presenta en forma de dímero preformado mientras que TLR8 forma dímeros en el momento de la unión al ligando (26, 27) .

Toll-like receptor 4

El receptor TLR4 fue el primer miembro de la familia de los TLR identificado y el mejor caracterizado hasta la fecha. El TLR4 participa en el reconocimiento y respuesta frente a las infecciones sistémicas bacterianas, principalmente las originadas por bacterias Gram negativas (-). Su principal función es el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS), un factor de virulencia e inmunopotenciador que está presente en la pared celular de las bacterias Gram- (28). También se ha descrito que el TLR4 es capaz de reconocer otros componentes microbianos como proteínas de fusión y de la cápsula en algunos tipos de virus (29).

A diferencia de otros TLRs, el TLR4 es incapaz de reconocer por sí solo a su ligando, requiriendo la formación de un complejo de reconocimiento para poder llevar a cabo su función (30). Este complejo incluye dos proteínas accesorias: CD14 (cluster de diferenciación 14) y LBP (proteína de unión al lipopolisacárido), además de la proteína de señalización MD-2 (proteína de diferenciación mieloide 2). CD14 y LBP se encuentran ancladas a la membrana celular pero carecen de dominio citoplasmático, por lo que son incapaces de transducir señal alguna al interior celular tras el reconocimiento del ligando. La función de estas moléculas consiste en presentar el LPS bacteriano a MD-2, que a su vez se une a TLR4. Los mecanismos moleculares bajo los cuales el LPS es transferido desde CD14 a MD-2 no han sido completamente descubiertos, habiéndose sugerido incluso que la participación de CD14 no es necesaria para que tenga lugar la interacción de MD-2 con el LPS y la posterior señalización de TLR4 (31). Lo contrario sucedería con MD-2, una molécula imprescindible en la respuesta frente al LPS bacteriano, ya que su ausencia dentro del complejo implica el no reconocimiento de este ligando por parte de TLR4 (32).

Vías de señalización de los TLRs.

Gracias a la caracterización genética y bioquímica de las vías de señalización mediadas por TLR, se ha logrado identificar la mayoría de sus componentes, así como sus interacciones. De todos los componentes identificados, la molécula adaptadora MyD88 (Factor de Diferenciación Mieloide 88) representa un factor proximal esencial en la activación de la respuesta inflamatoria mediada por TLR. MyD88 actúa como punto de inicio de una ruta de señalización común a todos los TLR. También se ha demostrado que es posible desencadenar una vía de señalización alternativa e independiente del MyD88 representada por la molécula adaptadora TRIF (33).

La consecuencia final de la inducción de cualquiera de estas dos rutas de señalización es la expresión de citocinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras antimicrobianas y antivirales, así como de moléculas co-estimuladoras de macrófagos, células dendríticas y células NK con la subsecuente influencia sobre la respuesta inmune adaptativa (26).

Señalización dependiente de MyD88.

Cuando la activación de la vía es dependiente de MyD88, esta proteína se recluta y asocia con los TLRs a través de los dominios TIR de ambas moléculas (27). Este evento permite que MyD88 se una a IRAK-4 (Quinasa 4 asociada al receptor de IL-1) a través de su dominio intermedio y a IRAK-1 mediante su dominio de muerte (33). La proximidad entre ambas quinasas provoca que IRAK-4 fosforile a IRAK-1. IRAK-1 fosforilado entonces se une a la proteína TRAF-6 (Factor asociado al receptor de TNF), y ambos se disocian del complejo del receptor e interactúan con otras proteínas .

Señalización independiente de MyD88.

La vía independiente de MyD88 sólo es empleada por TLR3 y TLR4. Ambos receptores señalizan a través de la proteína TRIF (Adaptador que contiene el dominio TIR e induce IFN- γ y sólo TLR4 ocupa a la proteína TRAM (Molécula

adaptadora asociada a TRIF). La señalización de la vía independiente a MyD88 abarca la siguiente secuencia: la proteína acopladora TRIF recluta al complejo proteico TRAF6–TAK1–TAB2 que activa a las IKK permitiendo la liberación de NF- κ B. La molécula TRIF, también interactúa con el dímero TBK1/IKK ocasionando la translocación del factor nuclear IRF–3 (Factor regulador de IFN–3), y provocando la síntesis de interferón tipo I (IFN α/β) (34).

Polimorfismos en los genes PRR.

La observación de que una mutación en el gen TLR4 en ratones ocasionaba una alteración en la respuesta al lipopolisacárido (33), despertó el interés por el estudio de la variación genómica de los receptores de reconocimiento de patrones y las consecuencias en su interacción con los agentes patógenos. En la actualidad, hay un gran número de investigaciones enfocadas al estudio de variaciones polimórficas en genes que codifican para receptores inmunes innatos y su relación con los procesos patológicos, como la sepsis, enfermedades autoinmunes, desordenes de tipo alérgico y diferentes tipos de cáncer (Figura 2) (35-37).

En este sentido, se ha observado que la existencia de dos polimorfismos no sinónimos ubicados en la región codificante del gen TLR4 humano (D299G y T399I) y se asocian con una baja capacidad de respuesta a las endotoxinas en humanos, afectando la ruta de señalización del factor NF κ B y como consecuencia, el descenso en la producción de citocinas inflamatorias (38).

La presencia de estos polimorfismos se ha asociado al desarrollo de procesos patológicos como el asma y las enfermedades atópicas (39), al desarrollo de síntomas clínicos severos en pacientes con rinitis alérgica estacional, cuando se presentan junto a polimorfismos en la región promotora del gen TNF- α (–238A, –308G) (36), o bien al desarrollo de susceptibilidad a la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, en presencia de polimorfismos en la secuencia codificante del gen NOD2 (R702W, G908R y L1007fsinsC) y la región promotora del gen CD14 (–159T-C) (40). La mutación D299G del gen TLR4 humano también se ha asociado al incremento de susceptibilidad a padecer cáncer de mama (37).

De igual forma, se ha descrito que la presencia de polimorfismos en la región promotora del gen TLR4 humano puede influir en la respuesta inflamatoria a nivel de mucosas frente a la infección con *E. coli* uropatogénica (41). Concretamente en bovinos, un SNP en la región promotora y dos SNP en la secuencia codificante del gen TLR4 se han asociado con la susceptibilidad a padecer mastitis infecciosa por persistencia en la lactancia (42).

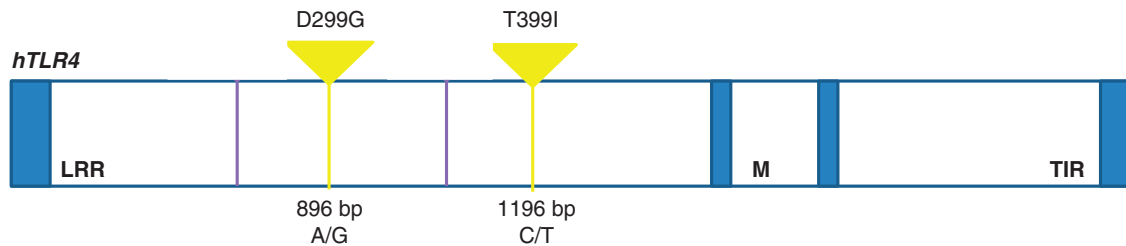


Figura 2. Representación esquemática de los SNPs del TLR4 asociados a la incidencia de enfermedad. Representación de las variaciones polimórficas en el TLR4. Cambio de *Asp* por *Gly* en la posición 299 y un cambio de *Thr* por *Ile* en la posición 399. Se ha relacionado ambos SNPs con el desarrollo de *shock* séptico y mayor riesgo del desarrollo de la enfermedad de Crohn e infecciones del tracto urinario. Abreviaturas: LRR, *Leucin rich region*; TIR, *Toll/IL1 receptor*. Modificado de Trejo de la O, A. *Genes and Immunity* 2014.

La presencia de dos polimorfismos no sinónimos del gen TLR2 humano (R753Q, P631H) en combinación con variaciones en el gen NOD2 aumentan la susceptibilidad a padecer procesos infecciosos por bacterias oportunistas. Este hecho se observó en pacientes que desarrollaron peritonitis bacteriana espontánea derivada de un cuadro clínico de cirrosis y ascitis (43). La presencia de polimorfismos en el gen TLR2 humano también se ha asociado con las primeras etapas de desarrollo de problemas asmáticos en niños (44). Además, una delación de 22 nucleótidos de la región promotora del gen TLR2 humano (-196 a -174) provoca una disminución en la actividad de TLR2, asociada con la susceptibilidad a padecer cáncer que es debida posiblemente a un fallo en el reconocimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* (45).

Existen también estudios que demuestran una relación entre la presencia de polimorfismos en el gen TLR5 con la susceptibilidad a padecer enfermedades inflamatorias intestinales. En perros, la presencia de tres polimorfismos no sinónimos en la secuencia codificante del gen TLR5 está asociada significativamente al desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal (46).

Otros autores han reportado una asociación entre la presencia de polimorfismos en los receptores intracelulares NOD1 y NOD2 con la susceptibilidad a presentar patologías de tipo cancerígeno, básicamente a nivel gástrico, debido a alteraciones en el reconocimiento del patógeno *Helicobacter pylori* (47). En el caso del gen NOD1 humano en particular, se ha logrado determinar con exactitud que un SNP no sinónimo (E266K) está estrechamente relacionado con el desarrollo de cáncer gástrico de tipo inflamatorio debido a la infección por *Helicobacter pylori* (48). Por otra parte, tres mutaciones en el gen NOD2 (R334Q, R334W and L469F) se han asociado con un incremento en la susceptibilidad a padecer sarcoidosis y síndrome de Blau. Finalmente, la inserción de una base en el marco de lectura del gen NOD2 (23020insC) ha sido asociada al desarrollo de la enfermedad de Crohn junto con otras dos variaciones alélicas en dicho gen (R702W, G908R) (49).

Las investigaciones previamente descritas, demuestran la importancia de la identificación y caracterización de los polimorfismos presentes en genes que codifican para receptores de patógenos. El estudio funcional de los polimorfismos en genes de la respuesta inmune innata, como son los TLR y NLR, representa la base para el establecimiento de futuras estrategias para el control, prevención y tratamiento de las enfermedades infecciosas (50).

Células de la respuesta inmune innata

Monocitos

Los monocitos son un grupo de células circulantes en la sangre, médula ósea, y el bazo que constituyen aproximadamente el 10% de los leucocitos humanos, tienen características morfológicas típicas como su núcleo ovalado, la presencia de vesículas y gránulos citoplasmáticos que contienen lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos esqueléticos. En la sangre periférica tienen una vida media corta, entre uno y dos días y contribuyen a la renovación de los macrófagos y células dendríticas tisulares. Si en este tiempo no son reclutados al interior de los tejidos, mueren y son eliminados de la sangre (51). El proceso de entrada a los tejidos y diferenciación está controlado por citoquinas que actúan como quimioatrayentes,

factores de crecimiento y diferenciación. Los monocitos en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina (IL)-4 generan células dendríticas, mientras que cuando se diferencian en presencia de GM-CSF o el factor de crecimiento estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) se generan macrófagos (52).

Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de un precursor mieloide (CD34)⁺ y se liberan posteriormente al torrente sanguíneo donde exhiben heterogeneidad en términos de morfología, marcadores de superficie y capacidad fagocítica (52). Se han subdividido en tres subpoblaciones según la intensidad de la expresión del receptor de LPS, CD14, y el receptor FC γ III, CD16 (Figura 3) (53).

1. Monocitos clásicos, definidos por el fenotipo CD14⁺⁺ CD16⁻ que son el 85% de los monocitos totales.
2. Monocitos intermedios, CD14⁺⁺ CD16⁺, son aproximadamente un 5%
3. Monocitos no clásicos, CD14^{dim} CD16⁺, son aproximadamente un 10%

Las tres subpoblaciones tienen la capacidad de secretar citocinas pro-inflamatorias después de una estimulación con ligandos de TLRs. Sin embargo, la subpoblación de monocitos intermedios son los mayores productores de TNF- α , IL-1 β e IL-6 después de una estimulación con LPS (54). Los monocitos no clásicos CD14^{dim} CD16⁺ producen niveles de IL-10 muy bajos, a diferencia de la población de monocitos clásicos, los mayores productores de IL-10. (55). Las distintas subpoblaciones de monocitos expresan diferentes niveles de receptores tipo *scavenger* como el CD36 y el CD163, de receptores de quimiocinas como el CCR2, CCR5 y CX3CR1 y otros receptores como el CD206 (Figura 3) (56-58). Por lo tanto, estas subpoblaciones producen diferentes respuestas durante los procesos inflamatorios, sugiriendo que los monocitos pueden tener diferentes papeles durante la respuesta inflamatoria.

Los monocitos expresan múltiples receptores que intervienen en diferentes procesos durante la respuesta inmune innata. La activación de estos receptores muchas veces desencadena la activación celular y su consecuente respuesta. Entre estos receptores tenemos los TLRs. Los monocitos expresan TLRs intracelulares y extracelulares (58), siendo las células más respondedoras a ligandos de TLRs, tanto PAMPs como DAMPs (59). Una vez el monocito es activado por señales vía TLR,

secretará citocinas inflamatorias como el TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6 y quimiocinas, que intervendrán en la respuesta inflamatoria. Estas señales vía TLR también inducen la producción y secreción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 (60) y la expresión de moléculas como el CD80, CD86 y el MHC-II en su superficie. A través de estas moléculas de superficie, los monocitos tienen la capacidad de presentar antígenos y co-estimular las células del sistema inmune adaptativo (61). Otros receptores que se ven afectados por la estimulación vía TLR son los receptores de tipo *scavenger*, cuya función principal es actuar como receptores fagocíticos no dependientes de opsonización de patógenos. Además pueden captar lipoproteínas modificadas e intervenir en el proceso final de la inflamación reconociendo células apoptóticas para ser fagocitadas (62). Entre estos receptores se encuentran el CD163 que reconoce complejos de haptoglobina-hemoglobina y facilita el reconocimiento antigénico, la presentación de antígenos y la respuesta contra las infecciones. Su expresión baja en presencia de estímulos de TLR (63). Otro receptor *scavenger* es el CD36 que reconoce células apoptóticas y bacterias gram positivas. Está involucrado en diferentes procesos fisiológicos como la angiogénesis, inflamación, metabolismo lipídico y de azúcares en la respuesta inmune. Cuando los monocitos son estimulados vía TLR disminuye la expresión de CD36 en su superficie. (57). El CD206 es un receptor de tipo lectina que se une a la manosa de las glicoproteínas y glicolípidos, que forman parte de la pared celular de los microorganismos. De momento se desconoce si la señalización vía TLR puede modular la expresión de este receptor(62).

Los monocitos son considerados el reservorio de precursores mieloides para la renovación de macrófagos y células dendríticas de los tejidos (64). El M-CSF es necesario para la supervivencia de monocitos circulantes y potencia su capacidad fagocítica, la función de anti-microbiana y el incremento de la producción de citocinas. En condiciones de homeostasis, la diferenciación de monocitos a macrófagos está principalmente dirigida por el M-CSF, factor producido por células del estroma en la sangre y los tejidos (65). Los monocitos maduros expresan el receptor del M-CSF (M-CSFR) y de esta manera consumen el M-CSF circulante generando un bucle de retroalimentación, responsable de la posterior disminución de M-CSF circulante y con ello la disminución de la proliferación de monocitos (66). En un contexto inflamatorio, la diferenciación de los monocitos está controlada

principalmente por el GM-CSF que genera macrófagos de tipo inflamatorio (67). Los monocitos tienen una elevada plasticidad en su proceso de diferenciación que es tejido y/o estímulo dependiente (68).

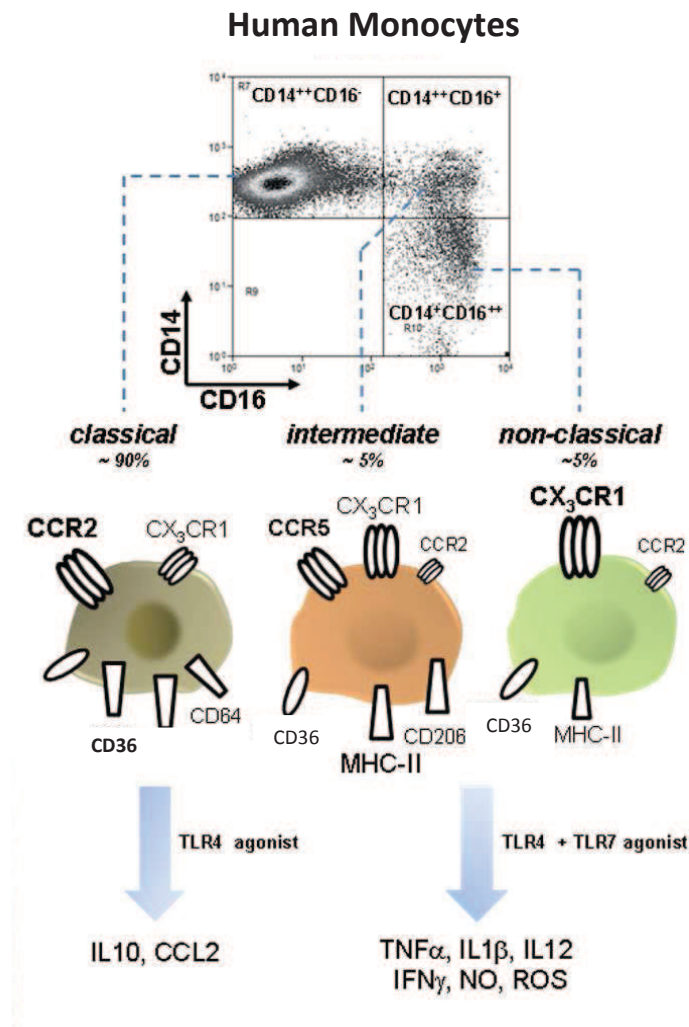


Figura 3. Subpoblaciones de monocitos y sus moléculas de superficie. Existen tres subpoblaciones de monocitos que expresan un amplio rango de moléculas que les confieren una potente capacidad de identificar células muertas, lípidos y patógenos bacterianos (CD36, CD64). Tienen una gran capacidad migratoria (CCR2, CCR5, CX3CR1) y de presentación antigénica (MHC-II). Responden de manera eficiente a estímulos de TLR produciendo citocinas y otros mediadores inflamatorios. Esta gran heterogeneidad se refleja también en estados posteriores de maduración y polarización. Modificado de Zimmermann HW, *Front physiol* 2012.

Macrófagos

Los macrófagos juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, debido a que actúan como primera barrera de defensa, al detectar y eliminar

partículas “extrañas” (microorganismos, macromoléculas tóxicas, células propias dañadas o muertas) mediante fagocitosis, secreción de enzimas, citoquinas o producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) (51). Durante la respuesta inmunitaria adaptativa, los macrófagos además, presentan antígenos a los linfocitos T en el contexto de MHC-II y/o MHC-I, y colaboran con la respuesta humoral en la eliminación de los agentes extraños. Los macrófagos tienen también un papel importante en los procesos de reparación y resolución de la inflamación, reclutando células del sistema inmune hacia los focos de inflamación, además de participar en los procesos de remodelación de la matriz extracelular y angiogénesis. En consecuencia, el término “macrófago” describe un tipo de células cuya finalidad principal es el mantenimiento de la homeostasis y la integridad tisular (69).

Los macrófagos se originan a partir de HSC, y derivan en parte de monocitos circulantes que se extravasan a los tejidos por la influencia de citocinas y quimiocinas. Hay también un porcentaje de macrófagos residentes en los tejidos (aprox. 10%) que no derivan de los monocitos circulantes. Estos macrófagos principalmente del saco vitelino y el hígado fetal. Los macrófagos derivados del saco vitelino tienen un patrón de diferenciación diferente, en el que pasan directamente a estado de macrófagos maduros en los tejidos fetales sin pasar antes por el estadio intermedio de monocito. En la mayoría de tejidos, estos macrófagos pueden estar presentes hasta la edad adulta, excepto en el tejido intestinal donde la fuente principal son los monocitos circulantes (70). Los macrófagos derivados del hígado fetal, provienen de monocitos originados en el hígado fetal, proliferan y se diferencian en macrófagos maduros en los tejidos, reemplazando a la población de los macrófagos que se originan del saco vitelino y se mantienen aun reminiscentes en el escenario inflamatorio en la edad adulta. (51, 71).

Los macrófagos son células multifuncionales y heterogéneas presentes en los tejidos, donde monitorizan el microambiente local y mantienen la homeostasis tisular. Estos macrófagos expresan un amplio panel de receptores: *scavenger*, de reconocimiento de patógenos y de citocinas. Además estos macrófagos, desempeñan varias funciones tejido-específicas lo que hace que tengan un gran diversidad fenotípica (72). Distintos “*master*” reguladores transcripcionales controlan el desarrollo de estos diferentes fenotipos tejido-específicos, y a su vez la delección

de estos “*masters*”, dan como resultado la supresión de subgrupos particulares de macrófagos tisulares (73, 74). También los macrófagos pueden tener una polarización funcional como respuesta a señales medioambientales (68). Los programas de polarización más conocidos de los macrófagos son: la activación clásica (M1) (LPS, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF) y la activación alternativa (M2) (IL-4, IL-13 y M-CSF) (75). Factores de transcripción como STAT1, STAT6, C/EBP β , IRF-4, IRF-5 y PPAR γ regulan programas de transcripción que controlan la polarización de los macrófagos M1/M2 (76).

Los macrófagos M1 son redondeados mientras que los M2 presentan una morfología elongada en forma de huso. Los macrófagos M1 expresan mayores niveles de HLA-DQ y HLA-DR y los macrófagos M2 presentan mayor expresión de CD14, M-CSFR y CD163. Ambos tipos de macrófagos expresan niveles similares de TLR2 y TLR4. Desde el punto de vista funcional y fenotípico, ambas poblaciones de macrófagos se comportan de forma diferente (Tabla 2) (77, 78). Los M1 tienen mayor capacidad de presentación de antígeno. Por su parte, los M2 presentan mayor capacidad de fagocitosis mediada por receptores de Fc γ III (CD16), mayor actividad fungicida debida a la producción de ROS, y mayor producción de H₂O₂ en respuesta a estímulos fagocíticos (79).

Los macrófagos localizados en tejidos (pulmón, placenta, mucosas intestinales y zonas peritoneales) se encuentran continuamente expuestos a patógenos y desafíos ambientales. Por ello existen mecanismos de inhibición “temporal” de las funciones de estos macrófagos para que sólo se generen reacciones pro-inflamatorias cuando son absolutamente necesarias y así evitar daños colaterales en el tejido. Los macrófagos peritoneales y los situados en el intestino son ejemplos de macrófagos que han desarrollado estrategias para reducir sus funciones efectoras inflamatorias. Los macrófagos aislados de muestras de diálisis peritoneales son fenotípica y funcionalmente similares a los macrófagos anti-inflamatorios generados *in vitro*: exhiben alta capacidad de fagocitosis, endocitosis y macropinocitosis, producen mayoritariamente IL-10 tras estimulación, y una disminuida capacidad de estimulación de células T (77).

La variedad de estímulos de activación/desactivación de macrófagos, combinada con la heterogeneidad y plasticidad de los macrófagos residentes en tejidos en

condiciones homeostáticas, permite que los macrófagos cambien constantemente su estado según el estímulo que perciben (78). Así, el IFN- γ producido por células

Tabla 2. Fenotipo de los macrófagos M1/M2 (80).

Características	M1	M2
Antígenos de superficie		
CD11b	++	++
CD11c	++	++
CD14	-	++
CD71	+	-
CD163	-	+
CD209	-	+
HLA-DR	++	+
HLA-DQ	+	-
710F	+	-
Receptores		
Fc γ R I (CD64)	+	+
Fc γ R II (CD32)	+	+
Fc γ R III (CD16)	-	+
Receptor "scavenger" tipo A	+	+
M-CSFR (c-fms)	+	+++
Integrinas	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$
Funciones		
Fagocitosis mediada por Fc γ R	Débil	Fuerte
Producción de H ₂ O ₂	Débil	Fuerte
Sensibilidad a H ₂ O ₂	Resistente	Sensible
Actividad catalasa	Alta	Baja
Susceptibilidad a HIV-1	Resistente	Susceptible
Susceptibilidad a <i>M. tuberculosis</i>	Susceptible	Resistente
Producción de IL-10	Débil	Fuerte

Th1, T citotóxicas CD8+ y células NK, convierte a los macrófagos en células con elevada capacidad citotóxica, microbicida (especialmente de patógenos intracelulares) y anti-proliferativa. La adquisición de estas propiedades se ve reflejada en la producción de mediadores tóxicos (ROS, RNS) y citocinas pro-inflamatorias (81). Este tipo de activación, denominada clásica (M1), da lugar a unos macrófagos que secretan altos niveles de IL-12 e IL-23 y muy bajos niveles de IL-10 en respuesta a diferentes patógenos, como por ejemplo el *Mycobacterium*, y promueven fuertes respuestas inmunitarias Th1. Las funciones inflamatorias y citotóxicas de los macrófagos así activados han contribuido a la percepción de que

sólo citocinas Th1 promovían activación de macrófagos, mientras que citocinas de tipo Th2 los bloqueaban o desactivaban. Sin embargo, en realidad las citocinas Th2 provocan un aumento de las funciones de los macrófagos como presentación de antígeno, reparación tisular y capacidad endocítica, además de inhibir respuestas Th1. Por ello, los factores que inhiben la generación y actividad de los macrófagos M1 (citocinas Th2, IL-4 e IL-13, citocinas desactivadoras, IL-10 y TGF β , glucocorticoides y vitamina D3), e incluso las células apoptóticas, han sido agrupados como inductores de una forma “alternativa” de activación de macrófagos M2 . Los macrófagos M2 producen grandes cantidades de IL-10 y TGF β y niveles muy bajos de IL-12 bajo estimulación, y pueden presentar funciones inmunosupresoras e inhibir la proliferación de células T (82). Las diferencias en las funciones entre macrófagos M1 y M2 han sido demostradas en numerosos ensayos in vitro, donde los M2 inducen mayor proliferación celular y deposición de colágeno de células fibroblásticas, e inhiben la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos (83). Los M2 también contribuyen a la vascularización in vivo y exhiben actividad angiogénica in vitro (84). Numerosos estudios han demostrado que los M2 activados con IL-4 son también esenciales en la eliminación y encapsulamiento de parásitos (81).

Aunque el término M2 fue inicialmente propuesto para identificar exclusivamente a macrófagos activados con IL-4/IL-13, la variedad de estímulos anti-inflamatorios que provocan una activación “no clásica” de macrófagos ha hecho necesario establecer una nomenclatura más precisa. Se han clasificado estas formas de activación alternativa de acuerdo con el estímulo inductor: los macrófagos estimulados por las citoquinas Th2 IL-4/IL-13 son denominados M2a, los activados por complejos inmunes y ligandos de TLR son denominados M2b y los macrófagos activados en presencia de IL-10 son denominados M2c (75, 82) (Figure 4). Recientemente se ha propuesto otra clasificación de macrófagos activados de acuerdo con sus funciones en el mantenimiento de la homeostasis: macrófagos involucrados en la defensa del organismo, en reparación de heridas y en regulación inmunitaria. Sin embargo, es preciso enfatizar que además de estos tres grupos es posible definir numerosos estados funcionales intermedios, lo que avala la existencia de un amplio rango de estados de activación de macrófagos (72).

La gran heterogeneidad de los macrófagos se ve reflejada en la expresión de una gran variedad de moléculas de superficie según las funciones y el contexto de su polarización en los tejidos.

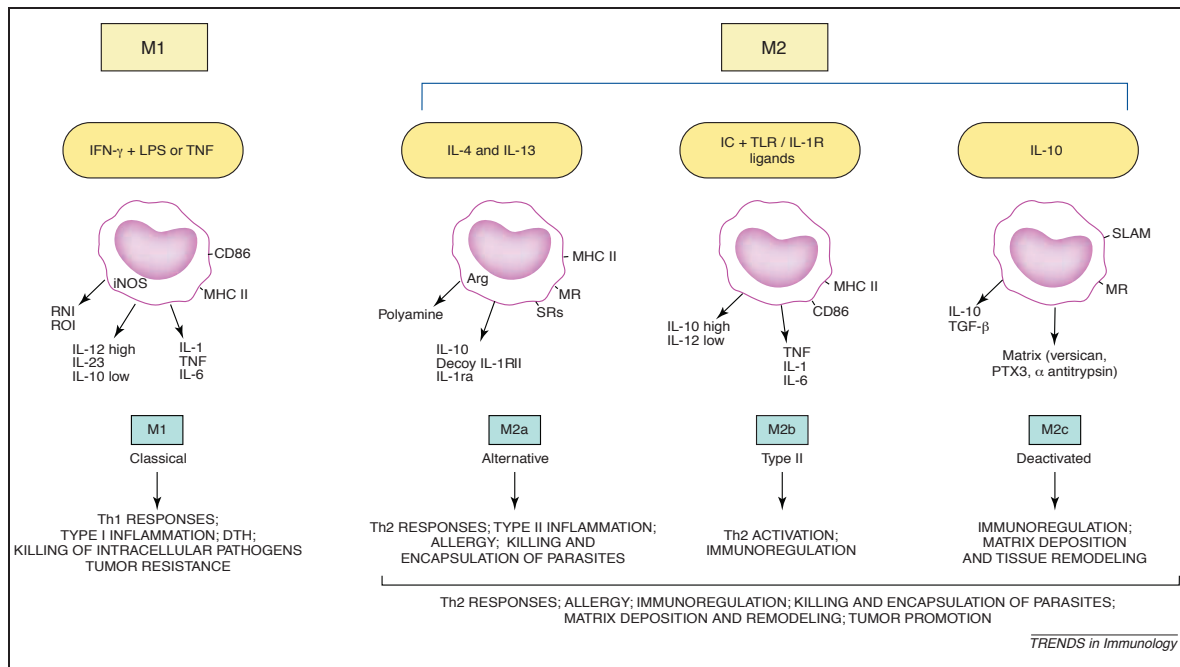


Figura 4. Poblaciones de macrófagos según su polarización. Los macrófagos una vez polarizados adquieren propiedades funcionales diferentes en respuesta a señales derivadas de su entorno (citocinas y ligandos de TLR). Los M1 tiene una mayor actividad citotóxica y capacidad antitumoral, mientras que los M2 son en general más inmunoreguladores. En particular M2a y M2b exhiben funciones inmunoreguladoras y conducen a respuestas de tipo Th2. Los M2c están más relacionados con la supresión de la respuesta inmune y el remodelado tisular. Abreviaturas: DTH, *delayed-type hypersensitivity*; IC, *immune complexes*; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; MR, *mannose receptor*; PTX3, *the long pentraxin PTX3*; SLAM; *signaling lymphocytic activation molecule*; SRs, *scavenger receptors*. Mantovani A. Trends in Immunol 2001

- el CD11b actúa en conjunto con el CD18 formando un receptor heterodimérico transmembrana tipo I conocido como *Mac-1/complement receptor 3 (CR3)* que puede contribuir a la señalización vía LPS. El CD11b está altamente expresado en varios tipos celulares como macrófagos y células dendríticas y puede unir múltiples ligandos como productos activadores del complemento (iC3b/C3b) y el LPS, siendo el CD11b un regulador positivo de la respuesta vía TLR4 (85).
- SR-A1 y el CD163 están aumentados en los M2 y contribuyen con sus funciones típicas: eliminación de células apoptóticas, secuestro de citocinas

inflamatorias, eliminación de complejos hemoglobina-haptoglobina en los sitios de daño tisular y la subsecuente producción de citocinas.

- La expresión de CD36 en macrófagos M1 contribuye a un fenotipo característico, ya que forma un complejo con el TLR4 potenciando la producción de citocinas inflamatorias. Además, el incremento en la expresión de este receptor aumenta la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la acumulación intracelular de colesterol (62).
- El receptor de manosa C tipo 1 (MRC1) conocido como el CD206, es un receptor expresado principalmente en la población de macrófagos M2 y que reconoce azúcares sulfatados y polisacáridos de membrana con terminaciones de manosa y fucosa, azúcares que se encuentran normalmente en microorganismos y algunas glicoproteínas endógenas (86).
- Receptores de inmunoglobulinas Fc de alta afinidad que reconocen e internalizan productos opsonizados (bacterias) e inmunocomplejos que son degradados y serán antígenos presentados a las células T. Los macrófagos expresan CD64 (FcR γ I), CD32 (FcR γ II) y CD16 (FcR γ III). Sin embargo, según su entorno y polarización expresan unos u otros alternativamente. Los macrófagos M2 expresan bajos niveles de CD64 ya para su polarización a M2 es necesaria la IL-4 y esta citocina disminuye la expresión de CD64. Por el contrario este receptor está altamente expresado en poblaciones de macrófagos aislados de tejidos inflamados (ascitis tumoral o colón inflamado de pacientes con la enfermedad de Crohn). La expresión de CD16 es alta en macrófagos y con expresión variable según la zona de la que provienen. Macrófagos provenientes de ascitis tumorales presentan una mayor expresión de CD16 que macrófagos provenientes de las zonas alveolares (87). En macrófagos de pacientes con cirrosis, se ha descrito un defecto en la fagocitosis asociado a una disfunción en los receptores Fc, y como consecuencia, una mayor incidencia de infecciones bacterianas, debido a una disminución en la capacidad de eliminación de la bacteria (88). Además, se ha descrito, que macrófagos del líquido ascítico peritoneal expresan en superficie altos niveles de CD14 y CD16, HLA-DR, receptores de quimiocinas (CCR2, CX3CR1) y CD163 (58, 89).

Neutrófilos

Los neutrófilos son continuamente generados en la médula ósea a partir de precursores mieloides. Su producción diaria alcanza los 2×10^{11} células (90). Este proceso es controlado por el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el cual es producido en respuesta a $IL-17\alpha$, citocina que es sintetizada por los linfocitos T (91). La producción de $IL-17\alpha$ está controlada por la $IL-23$, que es producida por macrófagos tisulares y células dendríticas. Durante la inflamación, el número de neutrófilos en los tejidos aumenta al ser atraídos a la zona infectada. Cuando se resuelve la inflamación, estas células se mueren apoptóticamente y son eliminadas por macrófagos y células dendríticas. Como resultado, hay una disminución de la síntesis de $IL-23$ y así se reduce la producción G-CSF (92).

El proceso de maduración del neutrófilo está controlado por factores de transcripción principalmente por el PU.1 y el *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP). Durante la maduración el neutrófilo pasa por varios estadios: mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito y finalmente la célula polimorfonuclear (90). Los gránulos de los neutrófilos se forman secuencialmente durante la maduración desde el estadio promielocítico. En humanos, entre un 50% y 70% de los leucocitos circulantes son neutrófilos. En la circulación tienen un tamaño en $7-10\mu\text{m}$, su núcleo es segmentado y su citoplasma está enriquecido con gránulos y vesículas secretoras (93).

En la cirrosis, las células polimorfonucleares circulantes se encuentran en un estado activado, posiblemente, por la exposición continua a productos bacterianos, como las endotoxinas (94). Como resultado los neutrófilos se encuentran “exhaustos”, lo que conlleva a una deficiencia de sus funciones (capacidad bactericida, fagocitosis, quimiotaxis)

Mecanismos microbicidas de los neutrófilos.

En el momento de la infección, los neutrófilos reconocen a los organismos invasores a través de receptores de reconocimiento de patrones, o de receptores para componentes del complemento activado o para la fracción constante de las IgGs

unidas al patógeno. Este reconocimiento desencadena la producción de moléculas pro-inflamatorias y la fagocitosis del microorganismo (90). En el interior del neutrófilo, los microorganismos son sometidos a dos sistemas microbicidas de distinta naturaleza: un sistema dependiente de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y otro independiente del oxígeno molecular (Figura 5). Los ROS son generados por reducción parcial del oxígeno molecular mediante la activación del metabolismo oxidativo, a través de un proceso que se denomina estallido respiratorio. Este proceso se inicia con la activación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa, producto de la estimulación de ciertos receptores que reconocen componentes de los patógenos. La oxidasa media la producción del anión superóxido (O_2^-) el cual constituye el sustrato para todos los ROS producidos por el neutrófilo, incluyendo el peróxido de hidrógeno, los radicales libres, los halógenos oxidados y las cloraminas (93). El peróxido de hidrógeno es producido por la dismutación espontánea o enzimática del O_2^- , y es a su vez, sustrato de la enzima mieloperoxidasa (MPO), responsable de la síntesis de oxidantes halogenados. Como consecuencia de las altas concentraciones plasmáticas del ión cloruro, el principal producto de la MPO es el hipoclorito (95). Este compuesto, puede también reaccionar en forma espontánea con aminas primarias o secundarias dando origen a otras especies oxidantes de larga vida media conocidas como cloraminas. Todas estas especies contribuyen en mayor o menor medida a la destrucción del microorganismo. Por otra parte, los microorganismos son también sometidos a la acción de enzimas y péptidos microbicidas que están empaquetados en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos (96). Cuando se produce el reconocimiento del patógeno, los gránulos se fusionan con la membrana plasmática o con la membrana de la vacuola fagocítica liberando su contenido. Según su morfología y contenido, estos gránulos pueden ser clasificados en 4 tipos: gránulos primarios que contienen MPO, serinoproteasas y proteínas antibióticas; gránulos específicos o secundarios que contienen lactoferrina y colagenasa entre otras enzimas y proteínas catiónicas; gránulos terciarios que albergan gelatinasa; y las denominadas vesículas secretorias, que poseen un gran número de receptores en su membrana y contienen únicamente proteínas plasmáticas como la albúmina ((95). Generalmente, el contenido de los gránulos primarios y de los específicos suele liberarse al interior de los endosomas una vez que los microorganismos son fagocitados en el foco de la infección. No obstante, la degranulación de los gránulos

terciarios y de las vesículas secretorias suele ocurrir durante el tránsito del neutrófilo desde el lecho vascular al foco del daño.

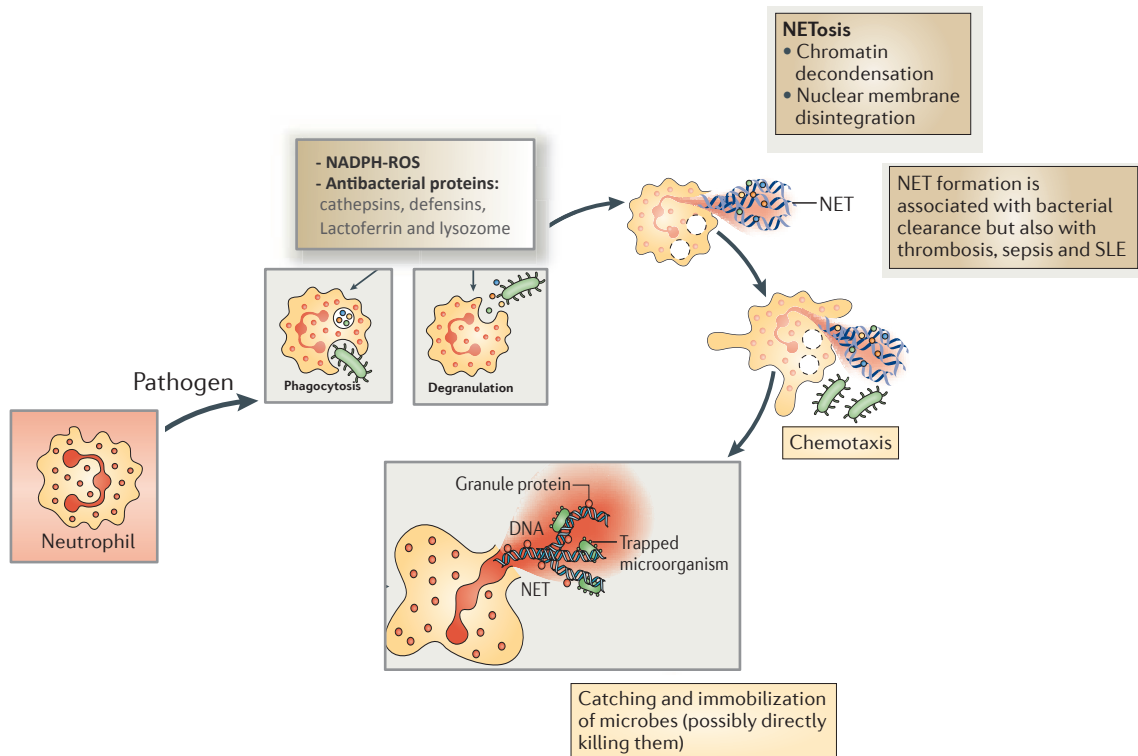


Figura 5. Mecanismos microbicidas de los neutrófilos. Los neutrófilos pueden eliminar los patógenos por múltiples vías. Una vez fagocitados y encapsulados los microorganismos en el fagosoma, los neutrófilos son capaces de matar los patógenos usando las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante el mecanismo NADPH-oxigenasa dependiente. Además las proteínas antibacterianas pueden ser liberadas desde los gránulos de los neutrófilos a los fagosomas o al espacio extracelular (degranulación). De esta manera actúan contra patógenos intra o extracelulares. También los neutrófilos activados pueden eliminar microorganismos extracelulares mediante la producción de las NETs (*neutrophil extracellular traps*). Las NETs están compuestas por histonas y enzimas como la mieloperoxidasa o elastasas que son producidas por los gránulos de los neutrófilos que van unidos a las NETs. Las NETs inmovilizan los patógenos evitando su dispersión y facilitando su fagocitosis o directamente matando el patógeno por medio de histonas antimicrobianas y proteasas. Modificado de *Kolaczowska E. Nat Rev Immunol 2013; Mantovani A. Nat Rev Immunol 2011.*

Las vesículas secretorias son las estructuras más rápidamente movilizables. En general, se fusionan a la membrana plasmática cuando el neutrófilo interactúa con el endotelio vascular, lo que conduce al incremento de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas durante la extravasación (97).

Los gránulos de gelatinasa están también implicados en el desarrollo de mecanismos microbicidas debido a que, al igual que los gránulos secundarios, son depósitos de la integrina Mac-1 (CD11b/CD18) y del citocromo b558 (un componente de la enzima NADPH oxidasa). Los neutrófilos también pueden

eliminar microorganismos extracelulares al capturarlos en estructuras formadas por cromatina y proteínas granulares que reciben el nombre de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (98). Las NETs se forman y liberan por estimulación de los neutrófilos con agonistas como LPS, IL-8, C5a, PMA y por microorganismos, factores que finalmente conducen a la disrupción de la membrana celular como último paso de una nueva forma de muerte a la cual se denomina NETosis. Durante este proceso, el núcleo pierde su forma lobulada, la eu- y heterocromatina se homogenizan, y luego, la envoltura nuclear y las membranas granulares se desintegran y el material nuclear toma contacto directo con los componentes de los gránulos. Finalmente, la membrana celular se rompe y las NET son liberadas concomitantemente con la muerte celular (98). Diversos patógenos como *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y el hongo *Candida albicans* inducen la formación de NETs y son atrapados por ellas. Las NETs degradan factores de virulencia y matan a bacterias Gram positivas y negativas así como también hongos unicelulares, posiblemente debido a que exponen a los patógenos a altas concentraciones locales de proteínas anti-microbianas como las elastasas y las histonas.

Citocinas producidas durante la señalización vía TLR en la respuesta innata

TNF- α

El TNF- α pertenece al grupo de citocinas que activan la producción de proteínas de fase aguda, además de ser pirogénica. El TNF- α es producido mayoritariamente por los monocitos/macrófagos activados, linfocitos T y células NKs. En las células diana, esta citoquina juega un papel en la apoptosis, supervivencia celular, inmunidad e inflamación (99). Inicialmente el TNF- α es sintetizado y expresado como proteína de transmembrana, y la porción extracelular es liberada de forma soluble cuando es cortada por la enzima metaloproteinasa convertidor de TNF- α (100). Las

respuestas generadas por el TNF- α se dan a través de la unión a uno de sus dos receptores TNFR1 ó TNFR2 que presentan diferentes funciones.

La señal vía TNFR1 provoca la activación de la actividad pro-inflamatoria y la inducción de la apoptosis asociada al daño tisular. Además, desencadena la activación de caspasas que inducen la apoptosis y la activación del NF- κ B y éste a su vez induce la expresión de diferentes genes inflamatorios. Por otro lado la activación vía TNFR2 activa la angiogénesis y la reparación tisular (101).

Entre los principales efectos pro-inflamatorios del TNF- α , la mayoría se dan a nivel endotelial. Las células endoteliales promueven la inflamación, presentando un patrón anatómico y distribución espacial diferentes (102). Una vez el TNF- α estimula las células endoteliales, éstas presentan diferentes combinaciones de moléculas de adhesión para los leucocitos: E-selectina, P-selectina, ICAM-1 i VCAM-1. También liberan quimiocinas, como la IL-8, CCL2, CXCL10 (103, 104), que dirigirán el reclutamiento de diferentes subpoblaciones de leucocitos para desencadenar la respuesta inmune en el tejido afectado. Por otro lado, el TNF- α induce la producción de ciclooxigenasa-2 que incrementa la producción de vasodilatadores, responsables de los signos característicos de la inflamación, como el calor y rubor de la zona afectada. Además el TNF- α aumenta la permeabilidad del endotelio, incrementado el paso de fluidos y macromoléculas para dar origen al edema que se observa durante los procesos inflamatorios (102).

Uno de los principales papeles fisiológicos del TNF- α es intervenir en las infecciones bacterianas, víricas y de parásitos (101). Esta citocina esta principalmente producida por monocitos y macrófagos en respuesta a ligandos inflamatorios, como los ligandos de TLRs. Sin embargo, también se puede generar después de la unión de diferentes ligandos a otros tipos de receptores celulares (99, 100).

Existe un aumento de TNF- α en el suero de pacientes con cirrosis que se podría originar por la estimulación persistente de las células del sistema inmune. con endotoxinas circulantes. Estas células son también las principales contribuyentes al incremento de los niveles de receptores solubles de TNF- α (TNFR1 y TNFR2) (105). Existe una correlación directa entre los niveles de TNF- α en suero y la capacidad de los monocitos de producir TNF- α . La producción de TNF- α está particularmente

incrementada en la cirrosis con ascitis (106). Los altos niveles de TNF- α incrementan la permeabilidad intestinal disminuyendo la expresión de las proteínas de unión en las células epiteliales intestinales, como las ocludinas, por la activación de la *myosin light chain kinase* (MLCK) (107-109). Clínicamente una alta producción de TNF- α se asocia con un aumento del daño celular en el hígado, lo que conlleva a un fallo renal y como consecuencia un mal pronóstico en la evolución de la enfermedad (110)

IL-10

La IL-10 es una citocina multifuncional, y su papel principal es limitar las respuestas inflamatorias, inhibiendo las funciones efectoras de monocitos y macrófagos tales como el estallido respiratorio, la producción de óxido nítrico (NO), la fagocitosis y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentra la IL-12, el TNF- α , IL-6, IL-1 β , y GM-CSF. La IL-10 también es capaz de regular el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B, las células NK, los linfocitos T CD4+, CD8+ y las células T reguladoras (Tregs), los mastocitos, granulocitos, células dendríticas, queratinocitos y células endoteliales (60).

La IL-10 es un péptido homodimérico de 35kD, compuesto por dos monómeros idénticos unidos de forma no covalente y está formado por dos dominios, cada uno de los cuales está compuesto por seis alfa-hélices. La IL-10 fue identificada originalmente en estudios con sobrenadantes de linfocitos Th2 que inhibían la expresión de citoquinas por macrófagos y por células Th1, así como la presentación de antígenos. La clonación de la IL-10 ha permitido una mejor caracterización de la citocina, mostrando sus múltiples actividades: estimulación de la proliferación de mastocitos y células B, secreción de anticuerpos y expresión del MHC-II (111).

Es una citocina tardía, producida después de la liberación de los mediadores pro-inflamatorios, Es secretada por la mayoría de leucocitos tras la estimulación con agonistas endógenos o exógenos, como el LPS o las catecolamines (112), que inducen su transcripción. En monocitos y macrófagos, la IL-10 afecta tres funciones importantes:

1. La presentación antigénica, inhibiendo la expresión del complejo MHC II y de las moléculas co-estimuladoras, como CD80 y CD86,
2. La liberación de mediadores inflamatorios en las células diana que han sido estimuladas por algunas citocinas pro-inflamatorias, o la síntesis de Ciclooxigenasa (COX)-2, mientras que potencia la liberación de mediadores anti-inflamatorios, como el antagonista del receptor de IL-1 β .,
3. El aumento de la fagocitosis de los antígenos y la regulación de la respuesta de las células T. La relevancia de esta citocina radica en su capacidad para limitar una reacción inmune excesiva y el daño tisular (113, 114).

En resumen, la IL-10 puede regular directamente la inmunidad innata y adaptativa (respuestas Th1 y Th2) limitando la activación y diferenciación de las células T en los nódulos linfáticos, suprimiendo la respuesta pro-inflamatoria en los tejidos y controlando la eliminación del patógenos y/o reduciendo el daño tisular (115).

En el hígado, la IL-10 puede ser producida por una variedad de células como los hepatocitos, las células de Kupffer, células estrelladas hepáticas y los linfocitos (116). La IL-10 se encuentra aumentada en la inflamación del hígado y se asocia con varias funciones protectoras durante el proceso de formación de fibrosis. En conjunto con la IL-22, disminuye la activación de las células estrelladas, evitando la producción excesiva de colágeno (117). En la cirrosis inducida con tetracloruro de carbono CCL₄, los animales IL-10-deficientes presentan una fibrosis hepática elevada con extensos infiltrados inflamatorios en comparación con los animales que no eran deficientes para IL-10. También se ha asociado el estado pro-inflamatorio persistente descrito en la cirrosis con una deficiente producción de IL-10 (118).

IL-6

La IL-6 es una citocina que presenta un efecto dual, actuando en algunos niveles como mecanismo de defensa para el organismo, pero durante procesos inflamatorios crónicos, presenta un papel pro-inflamatorio. Esta citocina es sintetizada por diferentes tipos celulares, pero la fuente principal son los monocitos

y macrófagos en los lugares de inflamación. La producción de esta citocina se induce cuando las células son estimuladas vía TLR o por citocinas inducidas por la activación vía TLRs. La IL-6 interviene en la reacción de fase aguda, estimulando los hepatocitos y originando la producción de citocinas de fase aguda. Una vez es secretada al exterior de la célula, la IL-6 ejerce su función a través del receptor específico de la IL-6, expresado de forma soluble y en la membrana de diversos tipos celulares como los hepatocitos, monocitos, linfocitos B, neutrófilos y algunas subpoblaciones de linfocitos T (119-121). La unión de la IL-6 a su receptor en la membrana activa el reclutamiento de una unidad con capacidad transcripcional, la proteína gp130. A continuación ocurre la homodimerización de gp130 y se da la activación de las tirosin quinasas de la familia JAK asociadas a las cadenas de gp130, que fosforilarán múltiples residuos de tirosina altamente conservados localizados en los dominios citoplasmáticos de gp130. Esta fosforilación induce el reclutamiento de factores de transcripción STATs. Estos STATs fosforilados formarán homo o heterodímeros que translocarán al núcleo celular, regulando la transcripción génica. (122). La fosforilación de gp130 también induce la unión de la tirosina fosfatasa SHP-2, aunque el residuo de fosfotirosina que reconoce es diferente a los de los STATs, dando lugar a la activación de la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) (123).

Mientras que la activación de la vía JAK-STAT se cree que está relacionada con las acciones pro-inflamatorias de la IL-6, la vía SHP2-MAPK podría estar implicada en las funciones sobre el crecimiento celular y supervivencia descritos para esta citocina. Las dos vías no son excluyentes y se ha observado regulación cruzada entre ellas, pudiendo compensarse(124).

En pacientes con cirrosis descompensada se ha observado un aumento de la producción de IL-6 circulante, del receptor soluble de la IL-6, y de la gp130 soluble (110). Se ha descrito a la gp130 soluble como un potente inhibidor de la señalización de la IL-6 en los hepatocitos (125). Esto podría explicar, la deficiencia en la respuesta en la fase aguda a esta citocina en los pacientes con cirrosis (126, 127). También la IL-6 ha sido asociada a un incremento en la permeabilidad intestinal por la inducción de la translocación de *E. Coli* comensal a través de las células epiteliales (128). En la peritonitis bacteriana espontánea (PBE) se han

descrito niveles aumentados de la IL-6 tanto en el suero como en el líquido ascítico, además de una correlación con diferentes parámetros clínicos relacionados con el daño hepático, el fallo renal y la baja supervivencia de los pacientes con PBE (110).

RESPUESTA INNATA EN LAS INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

La cirrosis. Definición

La cirrosis se define como el resultado de diferentes mecanismos de lesión hepática que conducen a la necro-inflamación y la fibrinogénesis. Histológicamente se caracteriza por una regeneración nodular difusa, rodeada por un septum fibroso denso, con una subsecuente extinción del parénquima y un colapso de las estructuras hepáticas. Todo esto conlleva a una pronunciada distorsión de la arquitectura vascular hepática. Esta distorsión tiene como resultado el incremento de la resistencia al fluido sanguíneo portal, desencadenando la hipertensión portal y la disfunción hepática (Figura 6) (129).

Clínicamente la cirrosis ha sido definida como una etapa final de la enfermedad hepática, que inevitablemente lleva a la muerte a menos que haya un trasplante de hígado. Esta percepción es controvertida ya que la mortalidad en la cirrosis en un año varía ampliamente desde el 1% al 57% dependiendo de la aparición de los eventos de descompensación clínica. Se ha propuesto, que el término cirrosis (término definido a partir de una base histológica) debería ser sustituido por enfermedad hepática avanzada, ya que es un proceso dinámico con un pronóstico variable. Además la fibrosis puede revertir si existe una terapia disponible, como un tratamiento antiviral contra la hepatitis crónica de tipo B o C (130). La cirrosis es frecuentemente indolora, asintomática y cursa desapercibida hasta que se presentan las complicaciones. Muchos de los pacientes nunca acuden a la consulta médica y muchas veces una cirrosis no se diagnostica hasta el momento de la autopsia. El diagnóstico de la cirrosis asintomática se da de manera casual en algún análisis de rutina realizado, donde se detectan niveles altos de transaminasas o

signos radiológicos que sugieren el daño hepático. Es entonces cuando los pacientes son sometidos a una biopsia de hígado. El 20% de los pacientes con hepatitis C y más del 10% de los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica podrían progresar a un estado de cirrosis. Por consiguiente, la biopsia de hígado este indicada en este grupo de pacientes considerados de alto riesgo, antes que los signos de la cirrosis se manifiesten. El inicio de las principales manifestaciones clínicas de los pacientes con cirrosis descompensada se caracteriza por la presencia de un notable deterioro de la calidad de vida con las complicaciones más comunes como lo son la hemorragia variceal, ascitis, peritonitis espontanea bacteriana (PBE) o encefalopatía hepática (131).

Cirrosis descompensada

La cirrosis descompensada se define por la presencia de ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía o ictericia (132)

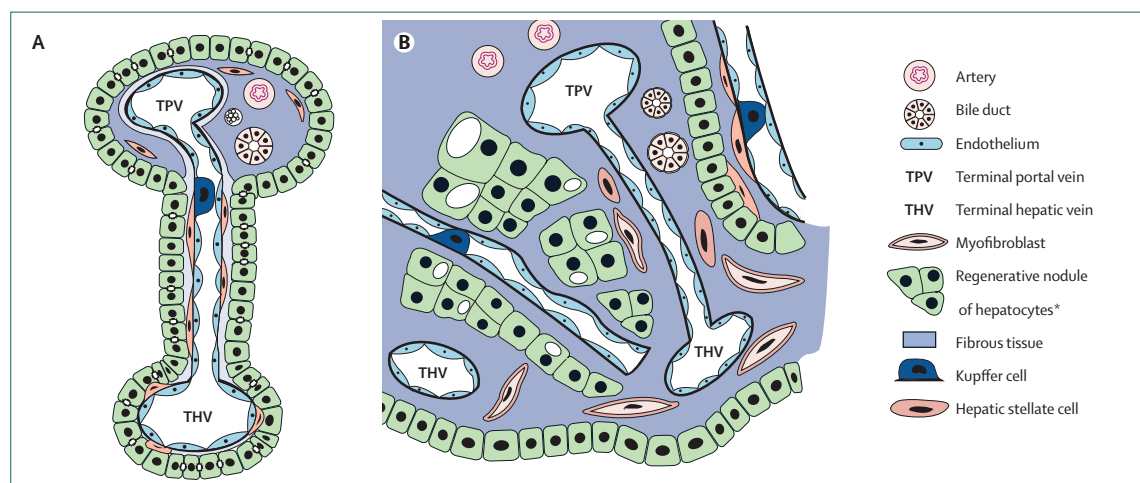


Figura 6. Alteraciones arquitectónicas y vasculares en la cirrosis. A) Hígado sano: La sangre que proviene del tracto portal terminal (TPV) circula a través de los sinusoides hepáticos donde el endotelio fenestrado sinusoidal reposa sobre el tejido conectivo libre (espacio de Disse) y permite un extenso intercambio metabólico con los hepatocitos lobulares; la sangre sinusoidal es recogida por las venas terminales hepáticas (THV) que desembocan finalmente en la vena cava. B) Hígado cirrótico: miofibrobalstos activados proliferan y producen un exceso de matriz extracelular (ECM). Este evento origina una expansión por fibrosis del tracto portal, caracterizada por la pérdida de las fenestraciones endoteliales, congestión del espacio de Disse con ECM y separación o encasquetamiento islotes perisinusoidales de hepatocitos desde el fluido sanguíneo sinusoidal por el septum colágeno. La sangre es dirigida desde las TPV y arterias a las venas centrales, con la consecuente hipertensión portal y el compromiso de la función de síntesis hepática. *Schuppan D. The Lancet 2008.*

Ascitis.

La ascitis se define como la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal (131). El principal mecanismo fisiopatológico de la formación de la ascitis, esta definido por el incremento del fluido sanguíneo a través de los órganos esplénicos que drenan en el sistema venoso portal, siendo este el principal factor de mantenimiento y empeoramiento la hipertensión portal. Esta anomalía hemodinámica del aumento del fluido sanguíneo es principalmente originada por un incremento en la producción de óxido nítrico (133). Inicialmente el organismo mantiene el volumen sanguíneo efectivo incrementando la cantidad de sangre bombeada por minuto. Sin embargo, a medida que la cirrosis progresa, este mecanismo no es suficiente y la activación homeostática de factores antidiuréticos y vasoconstrictores origina una subsecuente retención de agua y sales. Finalmente el fluido retenido se acumula en la cavidad peritoneal como resultado del incremento de la presión portal, formando la ascitis (134).

En el diagnóstico de la cirrosis, la ascitis está presente en el 20-60% de los casos (132). La supervivencia media tras la aparición de ascitis es alrededor de 4 años (135). La evolución clínica de los pacientes con ascitis se ve influenciada por determinados eventos que reducen la supervivencia, como la aparición de ascitis refractaria, la peritonitis bacteriana espontánea y el síndrome hepatorenal. Se define como ascitis refractaria aquella que no puede ser eliminada o cuya recurrencia no puede prevenirse con un tratamiento médico adecuado, bien por falta de respuesta a la dieta hiposódica y al tratamiento diurético, o bien cuando no se pueden administrar los diuréticos a dosis plenas por la aparición de efectos secundarios. Aparece en el 10% de pacientes con ascitis con una incidencia del 4% por año y una supervivencia del 35-50% (135, 136).

Peritonitis espontánea bacteriana (PBE)

La peritonitis bacteriana espontánea (PBE) es la infección más frecuente en la cirrosis y se define como la infección del líquido ascítico estéril, previamente formado, sin ninguna fuente de infección intra-abdominal aparente (137) La PBE

representa el 25% de todas las infecciones que se presentan en la cirrosis. La incidencia es de hasta el 65% al año en pacientes de alto riesgo (insuficiencia renal leve, proteínas en líquido ascítico < 1,5 g/dl y con bilirrubina ≥3 mg/dl) (138) La supervivencia al mes con un diagnóstico precoz y tratamiento antibiótico adecuado es del 80%, mientras que sin tratamiento es nula. Sin embargo, un 10% de los pacientes no responden al tratamiento inicial presentando una supervivencia al mes del 30-50%. Tras un episodio de PBE la probabilidad de recurrencia al año es del 70% con una supervivencia del 50-80% (139, 140). La profilaxis con quinolonas (norfloxacino) reduce el riesgo de recurrencia en un 20% aproximadamente (141).

Etiología de la PBE

Los episodios de PBE son monomicrobianos y son producidos en su mayoría por bacterias de origen entérico en los casos de adquisición comunitaria. Las bacterias gram negativas (-) están implicadas en un 68% de los episodios con cultivo positivo, siendo *Escherichia coli* el germen aislado con mayor frecuencia y presente en un 45% de estos cultivos (132), seguida de la *Klebsiella pneumoniae*. Las PBE polimicrobianas o secundarias, son una condición excepcional, y no se pueden descartar hasta el resultado final del cultivo bacteriano. Por otra parte, las bacterias gram positivas, principalmente *Streptococcus pneumoniae* o *Enterococcus*, son más prevalentes en pacientes con episodios de PBE de origen nosocomial, especialmente en aquellos que están sometidos a múltiples procedimientos invasivos o que son admitidos en cuidados intensivos. También se pueden detectar estos gérmenes en pacientes que están recibiendo profilaxis de la PBE, especialmente en aquellos que se encuentran en tratamiento con quinolonas a largo plazo (142).

Aunque los gérmenes anaerobios son predominantes en la flora intestinal de sujetos sanos, en una proporción 1000/1 en relación a los aerobios, el desarrollo de un episodio de PBE causado por una bacteria anaerobia es excepcional, y en los casos en que se desarrolla es imprescindible excluir una peritonitis bacteriana secundaria (143).

Patogenia de la PBE

Aunque la patogénesis de la PBE no está del todo bien definida, se conoce que se desarrolla en tres principales fases: el paso de bacterias a través del lumen intestinal a la circulación sistémica, una bacteremia secundaria a un defecto del sistema retículo endotelial (SER) y por último la infección de la ascitis debido a la deficiente capacidad bactericida del líquido ascítico (144). El lumen intestinal es el origen de la mayoría de las bacterias que causan la PBE (140, 145). Así mismo, el sobrecrecimiento bacteriano intestinal es un fenómeno común en pacientes con cirrosis y su prevalencia es mayor en pacientes con cirrosis avanzada y ascitis (136). La descontaminación de bacterias intestinales mediante la administración de antibióticos orales, producen una reducción significativa en la incidencia de la PBE. Sobre todo con fármacos como el norfloxacino que disminuye el paso de bacterias gram negativas de origen gastrointestinal al líquido ascítico.

La presencia de bacteriemia en aproximadamente la mitad de los casos de PBE y la aparición de casos de bacteremia aislada en pacientes cirróticos sin un foco primario de infección evidente (bacteriemia espontánea), sugieren que existe un paso previo cuando se permite a las bacterias su salida del lumen intestinal y así alcanzar la circulación sistémica antes de la colonización del líquido ascítico (146).

Translocación Bacteriana (TB)

El intestino desempeña importantes funciones, además de participar en la digestión, absorción y el metabolismo, ejerce un papel relevante como órgano neuroendocrino, inmunológico y de barrera entre el medio interno y la masa fecal. La barrera intestinal está formada en un 75% por material microbiano (4×10^{11} bacterias/gr) contabilizándose en su contenido, con más de 500 especies bacterianas distintas.

La alteración de la flora digestiva y el movimiento de los microorganismos a través de la pared bacteriana han sido aceptados como los principales sucesos en el desarrollo de infecciones bacterianas en los pacientes con cirrosis, incluida la PBE (146).

Se define como translocación bacteriana (TB) al proceso por el cual las bacterias de la flora intestinal migran a través de la barrera intestinal accediendo a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) y desde allí a otros territorios extraintestinales como el líquido ascítico y la circulación sistémica. Su diagnóstico requiere la presencia de bacterias viables en GLMs, de al menos una especie bacteriana (147, 148).

Patogenia de la Translocación Bacteriana

TB puede ocurrir cuando se dan simultáneamente una serie de hechos implicados tales como el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI), alteraciones de las defensas inmunitarias locales o sistémicas del huésped, cambios estructurales de la mucosa y probablemente el aumento de la permeabilidad intestinal.

La TB es un fenómeno que ha sido demostrado tanto en modelos experimentales de ratas cirróticas, como en humanos (149). En pacientes con cirrosis y sometidos a laparotomías para trasplante hepático, existen bacterias vivas en GLMs. Además, la translocación de organismos entéricos a los GLM en los pacientes con cirrosis avanzada es significativamente mayor (30,8%) que los con cirrosis leve y en pacientes no cirróticos (150).

La mayor parte de la información disponible sobre la TB proviene de los estudios realizados en modelos experimentales (151). Hay una incidencia del 50% de translocación bacteriana en ratas cirróticas frente a un 0-10% en ratas sanas. En estos casos, se observa identidad genética de las bacterias procedentes del líquido ascítico y de los GLM, lo que apoya el concepto de que TB contribuye al desarrollo de PBE (152).

Causas de la Translocación Bacteriana

La TB se produce cuando se altera la función barrera mecánica y/o inmunitaria de la mucosa intestinal (153). Los mecanismos que mantienen el equilibrio de la función barrera en un sujeto sano son principalmente de un tránsito intestinal adecuado que impida el sobrecrecimiento bacteriano intestinal, la integridad de la barrera intestinal y la competencia del sistema inmunitario local y sistémico.

Además del SBI, las alteraciones de la flora local también pueden contribuir a la translocación bacteriana. Entre 30 y 70% de los pacientes con cirrosis presentan un

SBI de enterobacterias aerobias en tramos altos intestinales y esta prevalencia es mayor en aquellos pacientes con cirrosis avanzada y ascitis (154). Esto se relaciona con la predisposición al desarrollo de la TB y la PBE a largo plazo, y se ve apoyado por la menor incidencia de PBE tras la reducción de la flora intestinal con el uso de antibióticos (155, 156). Existen diferentes factores relacionados con la deficiencia de la motilidad intestinal que explican la presencia de SBI en pacientes con cirrosis, tales como: el abuso de alcohol, la hipocloridia secundaria a uso de fármacos anti-secretores, o una secreción reducida de ácidos biliares. Además, determinados factores de virulencia tales como: la capacidad de adherencia a los receptores específicos localizados en las células epiteliales promoviendo una colonización inicial, la presencia bacteriana de capsula o la reducción de la síntesis de IgA en el lumen intestinal, facilitan la penetración de la bacteria a través de la mucosa. Así a las bacterias gram - translocan con mayor facilidad que el resto de gérmenes gram+ y anaerobios (Figura 7) (157, 158).

Alteraciones de la barrera intestinal

La pérdida de integridad del tejido epitelial que altera la función barrera, depende de varios tipos de uniones entre las células epiteliales intestinales que regulan la permeabilidad de iones y moléculas desde el compartimiento externo al compartimiento interno (vía paracelular). Las uniones se clasifican como: *tight junctions* o uniones estrechas, *adherent junctions* o uniones adherentes y desmosomas. Con estas uniones se forman dos barreras diferentes, la primera, entre la zona apical y la zona basolateral de las membranas celulares y la segunda entre la zona apical y el compartimiento basal. Las uniones adherentes y desmosomas forman sitios de unión y permiten la comunicación entre células adyacentes pero no determinan permeabilidad paracelular (159).

Estructuralmente las *tight junctions* están constituidas por 4 proteínas transmembrana: ocludinas, claudinas, tricelulina y moléculas de unión adhesiva o *junctional adhesion molecules* (JAM). Las tres primeras proteínas atraviesan la membrana cuatro veces formando dos bucles extracelulares de interacción.

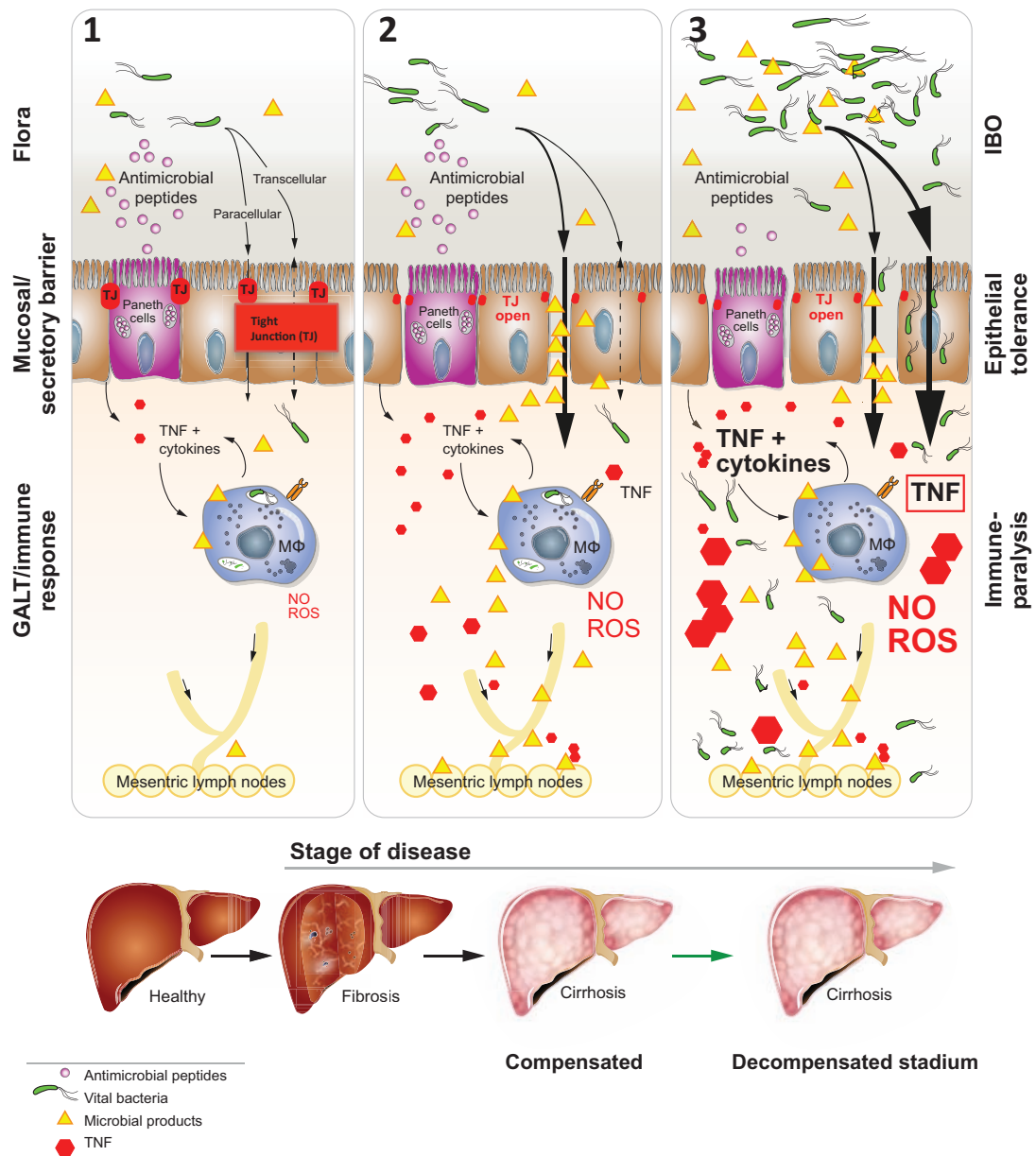


Figura 7. Estadios de la cirrosis y su relación con la Translocación Bacteriana. 1. Condiciones normales de una pared intestinal sana con translocación bacteriana exclusiva y normal. 2. Incremento en la translocación bacteriana y el aumento de la producción citocinas pro-inflamatorias (TNF- α) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) en el GALT (*gut associated lymphoid tissue*), generando un impacto directo sobre la barrera. 3. En condiciones de cirrosis con ascitis y sobrecrecimiento bacteriano intestinal (IBO), se aumenta el tránsito de bacterias viables desarrollando una parálisis de la respuesta inmune, generando un círculo vicioso perpetuando la translocación bacteriana y la ausencia de la capacidad de eliminar la bacteria. Modificado de *Wiest R. J Hepatol 2014*

Estructuralmente las *tight junctions* están constituidas por 4 proteínas transmembrana: ocludinas, claudinas, tricelulina y moléculas de unión adhesiva o *junctional adhesion molecules* (JAM). Las tres primeras proteínas atraviesan la membrana cuatro veces formando dos bucles extracelulares de interacción

homofílica y heterofílica con proteínas de las células adyacentes (en el caso de tricelulina el contacto será entre 3 células adyacentes). Los 3 dominios intracelulares de estas proteínas interactúan a nivel de su extremo carboxiterminal con proteínas de la *zonula occludens* (ZO), formada por las proteínas citosólicas ZO-1, ZO-2 y ZO-3, que actúan como acopladores a proteínas del citoesqueleto. En el dominio carboxiterminal se encuentran además sitios de fosforilación relacionados con varias *protein* quinasas como PKC, caseína quinasa y quinasa dependiente de AMPc (PKA). Las fosforilaciones son claves para mantener regulado el paso de moléculas a través de la vía paracelular (159).

Por último, las proteínas JAM provienen de la superfamilia de inmunoglobulinas y están caracterizadas por dos dominios, uno transmembrana y otro C-terminal. Estas proteínas establecen interacciones homofílicas, en las que un dominio extracelular interactúa con otras proteínas de adhesión del mismo tipo en células adyacentes, contribuyendo a la formación de *tight junctions* (Figura 8).

Existen alteraciones estructurales de la mucosa intestinal (edema, inflamación, cambios vasculares) tanto en ratas como en pacientes con cirrosis descompensada (160). En estos, hay un incremento en la amplitud de los espacios intercelulares y de la expresión de claudina 2 que sugieren un incremento de la permeabilidad intestinal de productos bacterianos (161).

La barrera intestinal también se puede ver alterada por el daño oxidativo de la mucosa. La hipertensión portal genera hipoxia local y con ella el daño oxidativo de la mucosa intestinal. Este daño favorece la TB en varios modelos experimentales de hipertensión portal, incluyendo la cirrosis (162).

La endotoxemia se define como la presencia de LPS en sangre periférica. El LPS constituye parte de la pared bacteriana de bacterias gram negativas, actúan alterando la inmunidad del huésped sobre todo produciendo una alteración linfocitaria y depresión del SER. En pacientes cirróticos con ascitis, estas alteraciones inmunes, favorecen la permeabilidad intestinal y la capacidad incrementada de dichas bacterias para atravesar la pared intestinal (158).

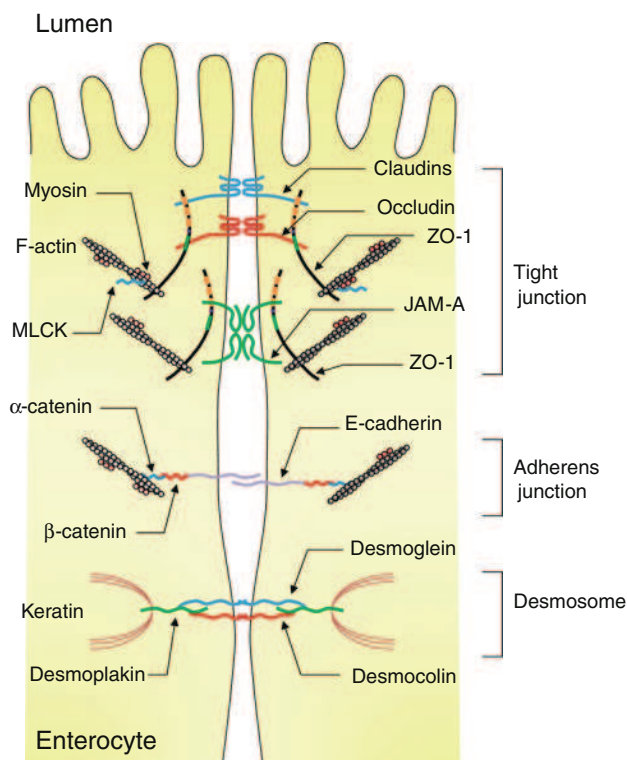


Figura 8 Estructura molecular de las uniones intercelulares de las células epiteliales intestinales. Las uniones intercelulares de las células epiteliales están definidas por diferentes complejos de proteínas como son: las *tight junctions*, *adherens junctions* y los desmosomas. Estas uniones crean una barrera que regula la permeabilidad paracelular y la comunicación intercelular de las células epiteliales. Suzuki T. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2013.

Alteraciones de la inmunidad en la translocación bacteriana

Además del efecto mecánico protector de la mucosa intestinal, esta controla el paso de bacterias y endotoxinas a través de la misma, depende de mecanismos inmunológicos como son el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, *gut associated lymphoid tissue*) compuesto por las placas de Peyer, linfocitos B y T, plasmocitos y macrófagos distribuidos por la lámina propia, linfocitos intra-epiteliales secretores de IgA y los ganglios linfáticos mesentéricos. Los defectos en la barrera intestinal no son los únicos responsables de la TB, sino también las disfunciones inmunes en la zona intestinal, pueden favorecer la TB en la cirrosis, al tratarse en realidad de una forma de inmunodeficiencia adquirida (158, 163).

Aunque no hay estudios específicos, las múltiples alteraciones inmunitarias sistémicas que presentan los pacientes cirróticos sugieren que la sistema inmune intestinal esté probablemente poco preservado. De hecho existe una correlación

inversa entre el número de células plasmáticas, secretoras de inmunoglobulina A (IgA) en la pared intestinal y la incidencia de TB . Este déficit local de IgA podría facilitar, de forma secundaria, la adherencia bacteriana a la superficie intestinal y constituye el primer paso en el proceso de la TB (164).

Por otra parte, las alteraciones en la funcionalidad de los macrófagos y células dendríticas también se han asociado a la aparición de TB. Sin una correcta función de estas células, los gérmenes que atraviesan el epitelio intestinal no serían captados ni eliminados eficientemente y podrían acceder de forma viable a los GLMs y posteriormente pasar a la circulación sistémica. La entrada de productos y/o bacterias vivas en los GLMs en el contexto de la cirrosis se puede deber a la reducción de mecanismos como la quimiotaxis, opsonización, fagocitosis y la capacidad de eliminar la bacteria por las células mononucleares (165).

En condiciones normales, las bacterias que alcanzan la circulación sistémica son eliminadas por el sistema mononuclear fagocítico (SER), localizado principalmente en el hígado y representado fundamentalmente por las células de Kupffer. En los pacientes con cirrosis, la capacidad funcional del SER está disminuida y esta se ha relacionado con la mayor gravedad de la enfermedad, mayor riesgo de bacteriemia y/o PBE, unido a una disminución en la supervivencia de estos pacientes (166).

En el caso de la PBE, la probabilidad de desarrollar una infección es inversamente proporcional a la capacidad bactericida del líquido ascítico. El exudado peritoneal normal posee una efectiva capacidad bactericida que viene mediada principalmente por el sistema del complemento, similar a la observada en exudados peritoneales neoplásicos y superior a la del líquido ascítico de pacientes con cirrosis. La llegada de bacterias al líquido ascítico induce la activación de los mecanismos bactericidas humorales del mismo, especialmente la vía alternativa del sistema del complemento (167).

Alteraciones de la inmunidad en el líquido ascítico

El líquido ascítico es una excelente herramienta para evaluar la respuesta inmune en el sitio de la infección. En el líquido ascítico existen factores inhibidores de la respuesta inmune, la depresión del SER, capacidad fagocítica disminuida y bajos niveles de complemento (168). Todo en conjunto lleva a una baja actividad anti-

bacteriana en el líquido ascítico (169). La presencia de lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana en el suero o el líquido ascítico es uno de los principales activadores de la producción de citocinas (IL-6, TNF- α) y del aumento de la respuesta inmune (170). Sin embargo, este mecanismo de defensa puede ser evitado por algunas de las cepas más virulentas de bacterias gram negativas. En los episodios de PBE debidos a cepas encapsuladas de *E. Coli*, los pacientes cirróticos, desarrollan un mayor número de complicaciones y tienen mayor mortalidad que los debidos a cepas no encapsuladas (171, 172).

Relación entre la microbiota y la PBE: consecuencias de la TB.

La microbiota intestinal humana esta compuesta por aproximadamente 10^{13} microorganismos que habitan principalmente en la zona distal del intestino. La microbiota presente en condiciones fisiológicas es conocida como microbiota normal, la cual preserva y promueve el bienestar y la ausencia de enfermedad, especialmente en el tracto gastrointestinal (173).

En condiciones normales, el número de bacterias alcanza valores diez veces superiores al de las células del organismo, constituyendo un “órgano” activo, cuyo metabolismo influye de forma decisiva en el mantenimiento de la homeostasis del individuo Dentro de las más de 500 especies descritas en el tracto gastrointestinal (TGI), unas 30 o 40 representan el 99% de los microorganismos y constituyen la microbiota normal, compuesta mayoritariamente por bacterias (174). Es importante resaltar, que cada especie animal presenta una composición microbiana intestinal distinta y específica, además, de que la densidad de esta, varía en las diferentes zonas del tubo digestivo (la microbiota aumenta en cantidad y complejidad a medida que avanzamos por el TGI). La microbiota natural del intestino es, por tanto, una población compleja de microorganismos que ejercen una gran influencia sobre el huésped (175).

Funciones de la microbiota.

Entre las funciones de la microbiota tenemos:

- Metabólicas: fermentación de residuos no digeribles de la dieta, formación de “mucus”, obtención de energía en forma de ácidos grasos de cadena corta (AGCCs), producción de vitamina K, absorción de iones.
- Tróficas: Control de la proliferación de células epiteliales y su diferenciación; desarrollo de la homeostasis del sistema inmune.
- Protección: efecto “barrera” frente a patógenos.

Una modificación en la proporción de organismos en el intestino, cualitativa o cuantitativamente, o en las concentraciones de los compuestos producidos por los mismos puede tener efectos importantes sobre el sistema inmune del huésped, desarrollándose diferentes condiciones patológicas.

El ecosistema intestinal está en equilibrio en condiciones normales y los microorganismos perjudiciales no ejercen su poder patogénico. Sin embargo, en determinadas situaciones, estos pueden dar lugar a infecciones si se establecen en regiones del cuerpo en las que no son residentes habituales o cuando su número se incrementa de forma excesiva debido a perturbaciones del ecosistema intestinal. En el ámbito de la cirrosis, la TB es una de las complicaciones más frecuentes, lo que convierte a la microbiota intestinal, tanto en composición como en número, en una parte muy importante en la que enfocar el estudio de esta enfermedad.

La TB desempeña un papel importante en las alteraciones hemodinámicas e inmunológicas de la cirrosis, mediada no sólo por el paso de bacterias viables a la circulación sistémica, sino también por sus componentes (la endotoxina y el ADN bacteriano han sido los más estudiados). La translocación de endotoxinas se asocia a la liberación de agentes vasodilatadores, como el óxido nítrico y monóxido de carbono. Por otra parte, el ADN bacteriano contiene múltiples series de dinucleótidos no metilados (CpG motifs), que una vez reconocidos por TLR9 se convierten en importantes activadores del sistema inmune innato, induciendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias y óxido nítrico, entre otros (176). La liberación de productos bacterianos durante la TB, tanto endotoxinas como ADN bacteriano, produce una respuesta inflamatoria mantenida en la cirrosis descompensada, que empeora las alteraciones hemodinámicas de la cirrosis (Figura 9). Las alteraciones inmunológicas asociadas a la cirrosis intervienen

perpetuando la translocación de bacterias y sus productos y, a la vez, ejerciendo un efecto sobre otros sistemas, como el circulatorio.

Manejo clínico de la PBE.

La PBE constituye una complicación importante y frecuente de la cirrosis hepática (177). Su tratamiento consiste básicamente en antibióticos intravenosos y albumina humana. El tipo de antibiótico que se escoge como tratamiento depende de diferentes factores: profilaxis previa con quinolonas (Norfloxacino), la prevalencia de tipos de bacteria en el líquido y si la infección fue adquirida en comunidad o en el entorno hospitalario. El tratamiento durante 5 días con cefotaxime intravenoso es suficiente en la mayoría de los casos en que la infección es adquirida en comunidad. Un ensayo clínico reciente demuestra que el tratamiento con albumina intravenosa (1,5g/kg al día 1 y 1g/kg en el día 3) disminuye el riesgo de fallo renal y muerte de un 70% a un 40% (178). El uso de inhibidores de la bomba de protones en pacientes con cirrosis y ascitis, debería ser muy limitado, ya que el riesgo desarrollar una PBE es de 4,3 veces más alto que sin tratamiento. En algunos casos debería ser detenido este tratamiento, por el alto riesgo de infección por *Clostridium difficile* (131). Dentro de las nuevas estrategias de tratamiento se busca la regulación de la microbiota intestinal y así prevenir que las bacterias logren infectar el líquido ascítico. Una de las estrategias que se esta estudiando es el uso de probióticos (179).

Probióticos. Generalidades.

Posiblemente el término “probiótico”, que etimológicamente procede del griego “pro bios” (por la vida), fue empleado por primera vez por Vergio en 1954, cuando comparaba los efectos adversos que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas ejercidas por otros factores que no pudo determinar. Una década más tarde, Lilly y Stillwell (1965) se referían a los probióticos como microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Fuller (1989) redefinió a los probióticos como “aquellos suplementos alimenticios integrados por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al hospedador que los consume mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal”.

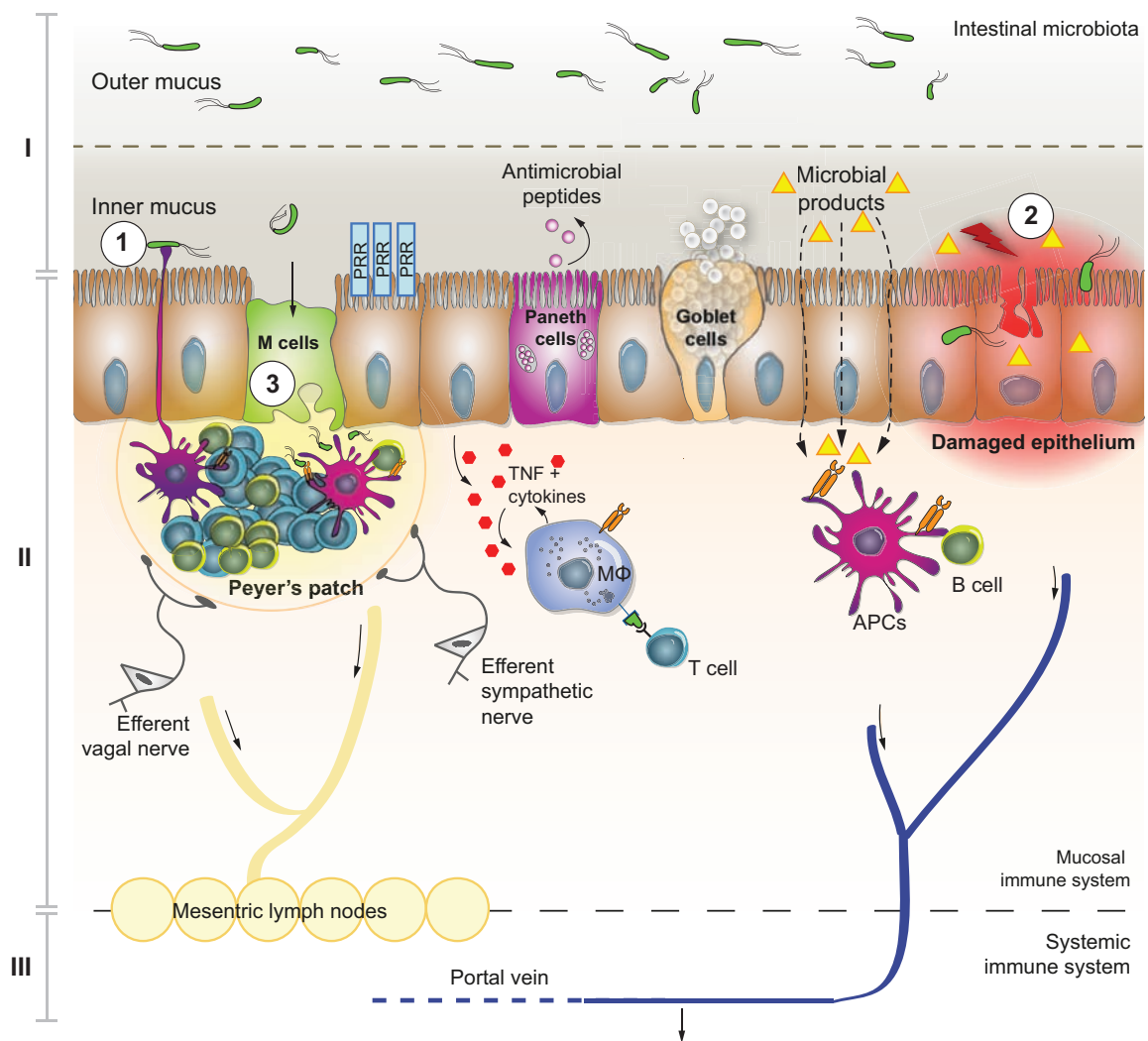


Figura 9. Compartimentos involucrados en la translocación bacteriana patológica y su respuesta inmune asociada. 1. Las células dendríticas procesan los productos bacterianos atravesando las células epiteliales sin afectar la función de las *tight junctions*. 2. Epitelio dañado e inflamado con una barrera epitelial disfuncional. 3. Las células M que se encuentran sobre las placas de Peyer, como células especializadas, permiten el acceso a productos microbianos que encuentran a las células presentadoras de antígenos (APCs). También se pueden observar tres niveles de barreras (I-III) contra la translocación bacteriana: (I) el lumen y el componente secretor (capa de mucus y péptidos antimicrobianos) de la barrera intestinal; (II) barrera epitelial mecánica y el GALT desencadenan una respuesta contra la translocación bacteriana produciendo por ejemplo, citocinas pro-inflamatorias; (III) el sistema inmune sistémico actúa como tercera barrera en el caso de que haya una expansión de los productos bacterianos más allá de los nódulos linfáticos. PRR, *pattern recognition receptor*. Wiest R. *J Hepatol* 2014

Recientemente, la OMS ha revisado su definición y los considera como “organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped” (179).

Microorganismos probióticos.

Los probióticos son microorganismos que promueven la salud de quienes los ingieren, y para que puedan considerarse como tales, es necesario que cumplan una serie de características, entre las que se incluyen:

1. Ser de origen humano, ya que, en teoría, las cepas aisladas de seres humanos sanos van a presentar una mayor facilidad para colonizar el intestino humano y probablemente no sean patogénicas, se ha utilizado para definir esta característica el acrónimo inglés “GRAS” (“*generally recognized as safe*”). No obstante, también se han utilizado probióticos de origen no humano, como *Saccharomyces cerevisiae*, demostrándose su seguridad tras el consumo regular por el hombre.
2. Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, ya que si los microorganismos probióticos han de llegar viables al intestino, es preciso que resistan el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares.
3. Han de ser capaces de colonizar el intestino, con un tiempo corto de replicación, y de adherirse a la mucosa intestinal para que tenga lugar la modulación de la respuesta inmune, así como la exclusión de microorganismos patógenos, si bien en esto último puede deberse también a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos.

Entre los microorganismos utilizados como probióticos, las bacterias lácticas y las bifidobacterias ocupan el lugar más destacado. También se utilizan con este fin bacterias que pertenecen a otro géneros, como *E. coli* y *Bacillus cereus*, así como levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*. Dentro de las bacterias lácticas se incluyen bacilos o cocos Gram-positivos de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Atopobium*, *Alloicoccus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium*, cuya característica común es la de ser productores de ácido láctico como principal producto final de su metabolismo (180). El género *Bifidobacterium* no está relacionado filogenéticamente con las bacterias lácticas, pero comparte con ellas diversas propiedades fisiológicas, bioquímicas y ecológicas (Tabla 3) (181).

Tabla 3. Diferentes tipos de probióticos comerciales y su composición.

Cepa (designaciones alternativas)	Nombre de marca	Fabricante
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter y Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru™ Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Morinaga Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATTC 55730	Retueri	BioGaia Biologics
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit y otros	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>bouardii</i>) lio	DiarSafe, Ultralevure y otros	Wren Laboratories, Biocodex, y otros
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 y <i>Lactobacillus casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ International
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 y <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansen
Analizado como mezcla: VSL#3 (mezcla de 1 cepa de <i>Streptococcus thermophilus</i> , cuatro <i>Lactobacillus</i> spp y tres cepas de <i>Bifidobacterium</i> spp)	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 y <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20		
Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011	A'Biotica y otros	Institut Rosell
Analizado como mezcla: <i>Bacillus clausii</i> cepas O/C, NR, SIN, y T	Enterogermina	Sanofi-Aventis

Los probióticos sobre el tracto gastrointestinal.

Clásicamente se ha atribuido el efecto de los probióticos a su capacidad de modificar la composición de la microflora intestinal de potencialmente dañina a beneficiosa para el hospedador. Sin embargo, el mejor conocimiento de estos microorganismos ha permitido establecer diferentes acciones a través de los cuales ejercen efectos beneficiosos (182):

1. Competición con bacterias patógenas

Los probióticos son bacterias sin capacidad patogénica, capaces de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y/o la acción de las bacterias patógenas.

Entre los posibles mecanismos se incluye una modificación del pH en el lumen intestinal, debido fundamentalmente a la producción de ácidos orgánicos, principalmente lactato y los ácidos grasos de cadena corta acetato, propionato y butirato, como consecuencia de su capacidad fermentativa sobre la fibra dietética.

Otro mecanismo involucrado es la producción de compuestos antibacterianos como pueden ser bacteriocinas o peróxido de hidrogeno (Jack et al., 1995; Liévin et al., 2000). Por ejemplo, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius* UCC118 inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos, como *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, como consecuencia de su capacidad de producir el factor antimicrobiano ABP118 (183).

Sin embargo, el desplazamiento de bacterias nocivas no necesariamente implica actividad bacteriostática o bactericida, sino que puede ser consecuencia de la competición física por unirse al epitelio, consumiendo también los sustratos disponibles para las bacterias patógenas. Así, distintos ensayos in vitro e in vivo han demostrado el efecto competitivo ejercido por *Bifidobacterium infantis* sobre el crecimiento de *Bacteroides vulgatus* (184).

2. Mejora de la función de la barrera intestinal

Un ejemplo en donde se ha demostrado el efecto de los probióticos sobre la mejora de la función de barrera del intestino, es en la enfermedad inflamatoria intestinal, donde la integridad de la barrera epitelial está comprometida, permitiendo el paso de antígenos a la lámina propia para desencadenar una respuesta inmune exagerada y contribuir de forma clave en la perpetuación del proceso inflamatorio en el intestino. Los probióticos podrían facilitar la reversión de esta situación y normalizar la permeabilidad intestinal incrementada, mejorando así la respuesta inflamatoria intestinal (185). Así, *Lactobacillus casei* y *Clostridium butyricum* promueven la proliferación de las células epiteliales intestinales en rata (hasta un 200% en el colon), mejorando de esta forma la protección del tejido intestinal (186).

3. Producción de nutrientes importantes para la función intestinal

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato, generados principalmente en el intestino grueso, son los productos finales en la fermentación llevada a cabo por la flora bacteriana comensal de los

carbohidratos procedentes de la dieta que no han sido digeridos en el intestino delgado. Son la principal fuente de energía para los colonocitos, regulando su desarrollo y diferenciación. Además, y en íntima relación con su capacidad de colaborar en la función de barrera intestinal, tienen efectos tróficos sobre el epitelio intestinal, lo que es de gran importancia para la recuperación de la integridad del epitelio en caso de daño y para la reducción del riesgo de translocación bacteriana, que puede tener lugar en situaciones de grave alteración de la barrera intestinal, como en la enfermedad inflamatoria intestinal (187). En concreto, el butirato tiene la capacidad de inducir enzimas (por ejemplo transglutaminasas) con un papel fundamental en la restauración de la mucosa dañada (188).

4. Inmunomodulación

Dada su localización intestinal y la posibilidad de interactuar con el epitelio de la mucosa, es evidente que los probióticos actúan tanto sobre la inmunidad intestinal específica como inespecífica, y que este hecho está íntimamente relacionado con sus efectos beneficiosos sobre el huésped. Numerosos tipos de lactobacilos pueden alertar al sistema inmune intestinal, y a su vez favorecer el rechazo de microorganismos infecciosos potencialmente lesivos. Esto lo pueden realizar mediante la producción de IgA, o la activación de células NK (189, 190). Otros efectos inmunomoduladores de estos probióticos se derivan de su capacidad para incrementar la actividad fagocítica de leucocitos intestinales, promover una mayor proliferación de linfocitos B junto con un aumento en la secreción de inmunoglobulinas (A y G), y estimular la producción de citoquinas como IL-2, IL-6 o TNF- α . Otros probióticos, como *E. coli* no patógeno o *Lactobacillus sakei*, tienen la capacidad de aumentar la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 o factor de TGF- β y, al mismo tiempo, reducir las de carácter pro-inflamatorio, por ejemplo TNF- α , IFN- γ o IL-8 (191). Cuando se administró una mezcla probiótica a pacientes con anastomosis íleo-anal, se pudo observar una disminución en los niveles de ARN mensajero de IL-1 β , IL-8 e IFN- γ , así como en el número de células polimorfonucleares, en comparación con los pacientes que recibieron el placebo. Ulisse et al., describieron una reducción de la expresión de las citoquinas IFN- γ e IL-1a y de la actividad iNOS en biopsias de pacientes con pouchitis tratados con probióticos. En explantes de la mucosa de íleon procedentes de pacientes con

enfermedad de Crohn, el tratamiento con *L. casei* y con *L. bulgaricus* redujo la liberación de TNF- α y el número de células CD4+ (192).

No se conoce con exactitud como interaccionan los probióticos con las células linfoides del intestino para conseguir la activación del sistema inmunitario intestinal. En este sentido, se ha propuesto que los lactobacilos pueden modificar la producción de citoquinas mediante la participación de algún componente de su pared celular que no ha sido totalmente caracterizado (193).

El efecto de los probióticos sobre la respuesta inmune no se limita a una actuación sobre el tejido intestinal, pudiendo afectar a la inmunidad sistémica, con claros efectos beneficiosos en diferentes afecciones de alta prevalencia, especialmente en la población infantil, como son el eczema atópico y las alergias en general (194).

No todos los probióticos ejercen los mismos efectos sobre el sistema inmune, existiendo una gran variabilidad entre especies, e incluso entre cepas pertenecientes a la misma especie. Por ejemplo, mientras que *L. acidophilus* aumenta la proliferación ex vivo de linfocitos en el bazo del ratón, otras especies de *Lactobacillus* como *casei*, *gasseri* y *rhamnosus* la inhiben (195). Ciertas cepas de lactobacilos tienen capacidad de estimular principalmente respuestas humorales y otras promover la inmunidad celular e inhibir la producción de anticuerpos. Así ocurre al comparar los efectos de la administración oral de *Bifidobacterium breve* YIT4064 y *Lactobacillus casei* Shirota, respectivamente. El uso de probióticos se asocia en la actualidad con un gran número de efectos beneficiosos en humanos, muchos de ellos establecidos de forma empírica, como la mejora de la intolerancia a la lactosa, la modulación del sistema inmunitario, la reducción de la hipercolesterolemia y la protección frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias y alérgicas. Sin embargo, no se debe asumir, que todos los probióticos posean las mismas propiedades beneficiosas. De igual manera, cuando se adscribe un efecto beneficioso a una cepa, este no se puede extrapolar a las restantes cepas de la misma especie. Incluso el efecto que una cepa puede presentar depende de las condiciones de su empleo y, muy particularmente, de la dosis. Se considera que la concentración de probióticos viables que debe llegar al intestino para producir un efecto beneficioso es $\geq 10^6$ ufc/ml en el intestino delgado y $\geq 10^8$ ufc/g en el colon (196)

Existen evidencias de la acción de los probióticos, pero aun es necesario justificar posibles mecanismos de acción que faciliten el desarrollo de microorganismos más efectivos y definir los límites de esta efectividad. En base a esto, pasamos a detallar algunos de los efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos, en concreto el VSL#3 con distinto grado de apoyo experimental.

El VSL#3 en la cirrosis.

El VSL#3 es uno de los probióticos más utilizados en la práctica clínica, actualmente se usa en el manejo de enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn) y el síndrome del intestino irritable (197). El VSL#3 contiene una mezcla de 8 especies bacterianas diferentes con efecto probiótico, estas especies son:

Bifidobacterium breve, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Se han evaluado los efectos del VSL#3 en pacientes con diferentes hepatopatías, sin embargo su mecanismo de acción aún no está bien definido (198). El tratamiento durante 3 meses con VSL#3 mejoró la función hepática y disminuyó los niveles de citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6, el daño oxidativo y la producción de óxido nítrico en pacientes con cirrosis de etiología alcohólica. En pacientes con cirrosis por virus de la hepatitis C se mejoró los niveles de las transaminasas y la producción de óxido nítrico. El principal problema del estudio de Loguercio et al., es que no es aleatorizado y no dispone de grupos control, lo cual cuestiona la validez de los resultados. En otro estudio posterior no se han observado efectos sobre la presión portal en pacientes con cirrosis e hipertensión portal tratados con VSL#3 (199).

Modelos experimentales en la cirrosis.

La investigación en medicina se basa principalmente en tres fuentes de conocimiento: el paciente, las necropsias y el animal de experimentación. Los

modelos experimentales se definen como cualquier sistema, lógico, físico o biológico capaz de simular total o parcialmente el proceso que pretendemos estudiar. Los modelos animales son los modelos más complejos y cercanos posibles a las condiciones reales. Se considera que un modelo experimental es un buen modelo si cumple una serie de requisitos, como que sea robusto, reproducible y que sea lo más semejante posible a la enfermedad que causa en humanos. Han de ser capaces de producir cambios patológicos discretos y graduales y conseguir una alta reproducibilidad y baja mortalidad.

Los modelos experimentales en cirrosis ya se abordaron desde 1936 por Cameron y colaboradores y, posteriormente, Korpassy Kovacs describió un modelo de cirrosis inducida por la administración crónica de ácido tánico en rata. Se han desarrollado modelos de cirrosis en ratas a través de la administración de toxinas o mediante la ligadura del conducto biliar. Sin embargo, hasta la fecha, no existe un modelo que reproduzca todas las características de las enfermedades hepáticas en el humano.

La investigación experimental de la fibrosis se ha realizado básicamente en rata y ratón. La utilización de agentes hepatotóxicos administrados de forma repetida es la manera clásica para inducir fibrosis hepática, siendo capaz de producir inflamación hepática y fibrogénesis. La tioacetamida, la dimetilnitrosamida, la dietilnitrosamida y el tetracloruro de carbono (CCl_4) son los más comúnmente utilizados. A continuación nos centraremos en el modelo del CCl_4 , que es a partir del cual desarrollamos nuestros modelos para el estudio en esta tesis.

Modelo de inducción de cirrosis por CCl_4

El modelo de inducción de cirrosis por CCl_4 es el modelo que mejor reproduce algunas de las características más relevantes de la cirrosis humana como la hipertensión portal, la inflamación hepática y sistémica, la formación de fibrosis, el síndrome de circulación hiperdinámica, la formación de ascitis, la TB a los GLM, las infecciones bacterianas y la regresión potencial de la fibrosis, entre otros. Es una gran herramienta para determinar tanto los mecanismos patogénicos de la cirrosis como para la caracterización de sus alteraciones inmunológicas debido a su gran paralelismo con el estado pro-inflamatorio sistémico descrito en pacientes (200).

El CCl_4 es una sustancia de elevada hepatotoxicidad. El CCl_4 no es tóxico *per se*, sino que sus efectos tóxicos son atribuibles a la generación del radical reactivo triclorometil (CCl_3^\cdot) tras ser metabolizado por el citocromo p450 por el enzima CYPE1 expresado en los hepatocitos perivenulares del hígado (201), con mínima expresión extrahepática y, por tanto, no ocasiona daño en otros órganos. El CCl_3^\cdot produce efecto citotóxico y peroxidación lipídica y daño hepático celular (202).

El CCl_4 se administra conjuntamente con fenobarbital, añadido al agua de bebida. El fenobarbital produce un aumento en la actividad del citocromo p450 en el retículo endoplasmático liso, y acelera el desarrollo de la fibrosis, haciendo que la acción del CCl_4 sea más efectiva (203).

Se han descrito diferentes métodos de administración: subcutánea, intramuscular, intraperitoneal (204), orogástrica (205) o por inhalación (206). La administración orogástrica de CCl_4 es posiblemente el método más utilizado sobretodo en el estudio de la fibrosis y de las infecciones bacterianas. Proctor et al., desarrolló un modelo de fibrosis mediante la administración por sondaje gástrico de CCl_4 en ratas Wistar. Runyon et al., posteriormente, optimizó la dosis en función de la variación de peso de la rata tras la administración oro-gástrica de CCl_4 , permitiendo así conseguir una elevada incidencia de ascitis y describiendo por primera vez la PBE en un modelo animal de cirrosis hepática. El modelo así establecido consiste en tratar ratas Sprague-Dawley de un peso entre 100-120 gr con fenobarbital en el agua de bebida de forma *ad libitum* a una dosis de 1,5 nmol/l. Cuando los animales llegan a los 200 gr se inicia la inducción de cirrosis con 20 μl . La dosificación irá aumentando en función de la variación de peso entre el día de la inducción y a las 48 horas después de tomar el tóxico. Una vez aparece la ascitis, la dosis de mantenimiento es de 40 μl CCl_4 . Con esta individualización de la dosis se consigue una elevada incidencia de cirrosis y de desarrollo de ascitis. Este modelo tiene una elevada mortalidad (50-55%), y suele ocurrir alrededor de las primeras semanas debido a la toxicidad aguda del CCl_4 (151). Es sin duda el modelo más utilizado para estudios de la cirrosis hepática, la PBE y las bacteriemias (207). Se considera un buen modelo debido a que la mayoría de animales que superan la fase aguda de hepatotoxicidad por CCl_4 desarrollan cirrosis micronodular a diferencia de otros modelos en los que se presenta esporádicamente. En este modelo, se desarrollan PBE y TB de forma espontánea (208) obteniendo evidencias de la identidad entre

las bacterias de la luz intestinal y las translocadas. No se observa lesión intestinal secundaria al tóxico (151, 209).

Pese a una gran aceptación, este modelo presenta una serie de limitaciones, entre las que destacan la gran variabilidad en la respuesta de los animales al tóxico, la elevada mortalidad, la administración del tóxico es variable para obtener cirrosis y/o ascitis y la ascitis infectada no es idéntica a la que presentan los humanos. En la rata la mayoría de los episodios de PBE son polimicrobianos (en un 66-75%), a diferencia de los pacientes donde casi siempre son infecciones monomicrobianas. Se obtienen con frecuencia cultivos positivos de *Enterococcus faecalis* y *Proteus* spp., y en humanos estos representan solo un 5% de las PBE. El diagnóstico de la PBE en la rata, teniendo en cuenta un nivel de PMN en líquido ascítico de 250/mm³, es controvertida, debido a la diferencia en los porcentajes de células de la sangre de la ratas, donde predominan los linfocitos, en comparación con los porcentajes en humanos donde predominan los neutrófilos.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La cirrosis deteriora la función homeostática del hígado. A lo largo de la cirrosis, aparecen las complicaciones de la enfermedad debidas, en parte, a la disfunción de la respuesta inmune innata, del defectuoso reconocimiento de PAMPs y el daño en la pared intestinal. Se limita la capacidad bactericida de células fagocíticas y con ello aumenta la susceptibilidad a las infecciones bacterianas. A partir de la continua señal de los PAMPs liberados por el intestino permeable de los pacientes con cirrosis, hay una activación persistente de las células inmunes y una inflamación sistémica. Esto se ve reflejado en la activación de células inmunes circulantes y el aumento de los niveles séricos de citocinas pro-inflamatorias, Factores como los polimorfismos en TLR pueden modular la respuesta inflamatoria de estos pacientes. A su vez, el estado pro-inflamatorio generado por la cirrosis puede afectar la capacidad funcional de las células del sistema inmune innato y la barrera intestinal. Con el empleo de probióticos se podría regular la translocación bacteriana y con ella la respuesta inmune y, reducir la severidad de las complicaciones de la cirrosis. La influencia de cada uno de estos aspectos nos va a ayudar a entender la cirrosis hepática y prevenir sus complicaciones.

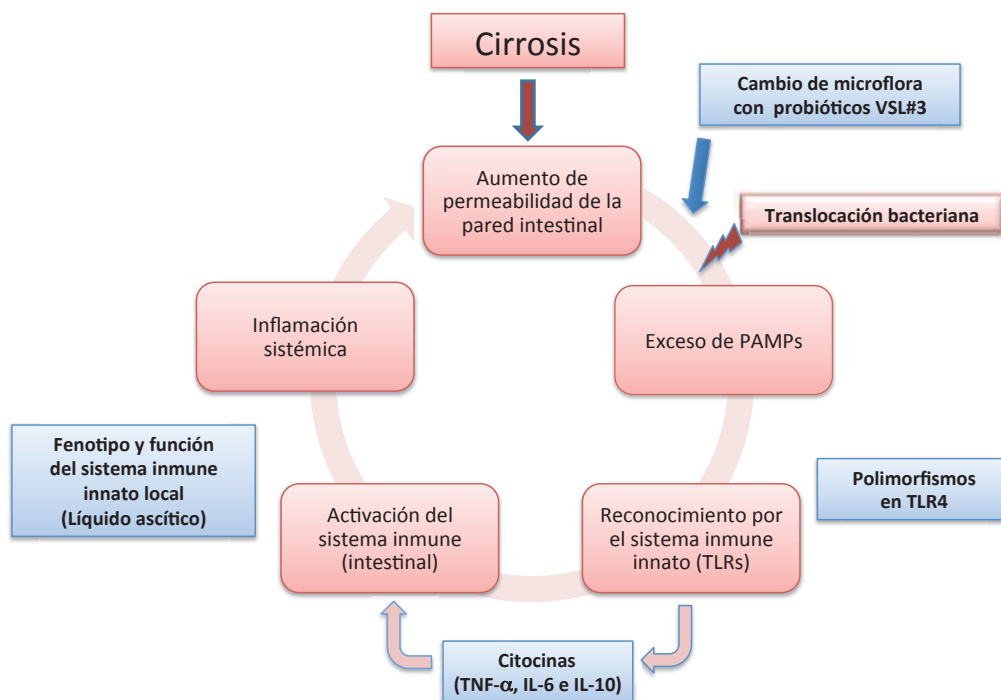


Figura 10. Esquema de la hipótesis. Rojo: hipótesis planteada, Azul: objetivos desarrollados durante la tesis.

OBJETIVOS:

General:

Analizar la respuesta inmune innata en la cirrosis hepática, definida por la producción periférica y local (ascitis) de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) y por el fenotipo y funcionalidad de los leucocitos presentes en el líquido ascítico, y, la relación de la respuesta inflamatoria con parámetros de evolución de la enfermedad y tratamiento.

Específicos:

1. Estudiar la relación entre la presencia de polimorfismos de la molécula TLR4 y la respuesta inmune. Se comparará la producción de citocinas de las células de sangre periférica de pacientes con cirrosis portadores o no del polimorfismo en TLR4.
2. Analizar la relación entre la producción de citocinas de las células de sangre periférica de pacientes con cirrosis portadores o no del polimorfismo en TLR4 y el desarrollo de las complicaciones de la enfermedad.
3. Comparar el contenido inflamatorio y la composición celular del líquido ascítico de pacientes con cirrosis y ascitis estéril, con PBE de cultivo bacteriano positivo y con PBE de cultivo bacteriano negativo.
4. Analizar la asociación entre la producción de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) con la composición y función de los leucocitos del líquido ascítico de pacientes con cirrosis y ascitis estéril, PBE de cultivo bacteriano positivo y PBE de cultivo bacteriano negativo.
5. Comparar la capacidad de fagocitosis y estallido respiratorio de las células de la respuesta inflamatoria innata con su fenotipo en diferentes contextos: ascitis estéril, PBE de cultivo bacteriano positivo y PBE de cultivo bacteriano negativo.

6. Comparar los cambios en el fenotipo y funcionalidad de las células de la respuesta inflamatoria innata de pacientes con cirrosis y PBE antes y después del tratamiento con antibióticos.

7. Valorar el efecto del probiótico VSL#3 en la translocación bacteriana, la barrera intestinal, la composición de la flora intestinal y la respuesta inflamatoria en el modelo experimental de cirrosis hepática inducida por CCl₄.

4. PUBLICACIONES



Cytokine production in patients with cirrhosis and *TLR4* polymorphisms

Juan Camilo Nieto, Elisabet Sánchez, Eva Román, Silvia Vidal, Laia Oliva, Carlos Guarner-Argente, Maria Poca, Xavier Torras, Cándido Juárez, Carlos Guarner, German Soriano

Juan Camilo Nieto, Silvia Vidal, Laia Oliva, Cándido Juárez, Department of Immunology, Institut de Recerca-IIB Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08025 Barcelona, Spain

Elisabet Sánchez, Eva Román, Carlos Guarner-Argente, Maria Poca, Xavier Torras, Carlos Guarner, German Soriano, Department of Gastroenterology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain

Elisabet Sánchez, Carlos Guarner, German Soriano, Department of Gastroenterology, Instituto de Salud Carlos III Institut de Recerca-IIB Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08025 Barcelona, Spain

Elisabet Sánchez, Carlos Guarner, German Soriano, Department of Gastroenterology, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), 08025 Barcelona, Spain

Eva Román, Xavier Torras, Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), 08025 Barcelona, Spain

Eva Román, Department of Gastroenterology, Escola Universitària d'Infermeria (EIU) Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain

Eva Román, Department of Gastroenterology, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08025 Barcelona, Spain

Author contributions: Nieto JC, Oliva L and Vidal S performed research, designed the experiments and analyzed data; Sánchez E and Román E contributed to acquisition and analysis of data; Guarner-Argente C, Poca M, Torras X and Guarner C contributed to acquisition of data; Juárez C contributed to analysis of data; Soriano G designed the experiments, contributed to the analysis and acquisition of data, and wrote the manuscript.

Supported by Health research fund "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (to SV); Catalan Ministry of Health Stabilization Program; and Institute of Health Carlos III, Ministry of Science and Innovation, Grant No. PI09/00357, Madrid, Spain

Correspondence to: Silvia Vidal, PhD, Department of Immunology, Institut de Recerca-IIB Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Avda. Antoni M.Claret, 167 (pavelló 17), 08025 Barcelona, Spain. svidal@santpau.cat

Telephone: +34-93-5537544 Fax: +34-93-5537598

Received: February 13, 2014 Revised: April 22, 2014

Accepted: June 26, 2014

Published online:

Abstract

AIM: To analyze the cytokine production by peripheral blood cells from cirrhotic patients with and without *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms.

METHODS: The study included nine patients with cirrhosis and *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms, and 10 wild-type patients matched for age, sex and degree of liver failure. *TLR4* polymorphisms were determined by sequence-based genotyping. Cytokine production by peripheral blood cells was assessed spontaneously and also after lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) stimulation.

RESULTS: Patients with *TLR4* polymorphisms had a higher incidence of previous hepatic encephalopathy than wild-type patients (78% vs 20%, $P = 0.02$). Spontaneous production of interleukin (IL)-6 and IL-10 was lower in patients with *TLR4* polymorphisms than in wild-type patients [IL-6: 888.7 (172.0-2119.3) pg/mL vs 5540.4 (1159.2-26053.9) pg/mL, $P < 0.001$; IL-10: 28.7 (6.5-177.1) pg/mL vs 117.8 (6.5-318.1) pg/mL, $P = 0.02$]. However, the production of tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-10 after LPS and LTA stimulation was similar in the two groups.

CONCLUSION: *TLR4* polymorphisms were associated with a distinctive pattern of cytokine production in cirrhotic patients, suggesting that they play a role in the development of cirrhosis complications.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key words: Inflammatory response; Hepatic encephalopathy; Genetic factors; Infections

Core tip: The relationship between toll-like receptors (TLR) polymorphisms and the immune response is the

focus of intensive research in chronic inflammatory conditions. This is the first study demonstrating that the presence of certain TLR4 polymorphisms is associated with a characteristic pattern of cytokine production. These polymorphisms could have a relevant role in the development of complications in patients with cirrhosis.

Nieto JC, Sánchez E, Román E, Vidal S, Oliva L, Guarner-Argente C, Poca M, Torras X, Juárez C, Guarner C, Soriano G. Cytokine production in patients with cirrhosis and *TLR4* polymorphisms. *World J Gastroenterol* 2014; 20(46): 00000-00000 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i46/00000.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i46.00000>

INTRODUCTION

A pro-inflammatory state is a frequent phenomenon in patients with cirrhosis and it has been related to several factors. One of these factors is the exposure to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [*i.e.* endotoxin or lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria] due to intestinal bacterial translocation^[1-6]. There is growing evidence that the inflammatory response in these patients is implicated in the prognosis and development of complications^[1,2,7,8], especially hepatic encephalopathy^[9-11]. Moreover, due to bacterial translocation and alterations in immune response, patients with cirrhosis are predisposed to develop bacterial infections, mainly caused by enteric pathogens^[1,2].

Toll-like receptors (TLR) recognize molecules broadly shared by pathogens but distinguishable from host molecules, collectively referred to as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). TLR2 recognizes multiple bacterial cell wall components (peptidoglycan, lipoteichoic acid and lipoproteins) by forming heterodimers with TLR1 and TLR6 and cooperating with CD14, CD36 and Dectin-1. In association with CD14 and its co-receptor MD-2, TLR4 recognizes LPS, a major component of gram-negative bacteria. It was reported that CD14 is also involved in TLR2-mediated lipoteichoic acid (LTA) stimulation^[12]. On the other hand, TLR2 seems to be required for LPS-induced TLR4 signaling^[13]. After the binding of TLR ligands, pro-inflammatory cytokines are released by the immune cell and systemic inflammatory response occurs^[3,14,15].

Two main non-synonymous *TLR4* genetic polymorphisms can usually be found in co-segregation in Caucasians^[14-16]. The first of these is D299G, an A/G polymorphism that causes the amino-acid change from Asp to Gly at position 299, and the other is T399I, a C/T polymorphism that causes the change from Thr to Ile at position 399^[14-16]. These polymorphisms have been shown to change the ligand-binding site of the receptor^[17]. They can modify the inflammatory response^[16,17] and predispose to bacterial infections^[14,15,18]. The presence of *TLR4*

polymorphisms can therefore influence disease progression and development of complications in patients with cirrhosis^[19,20].

We observed that cirrhotic patients with the *TLR4* D299G polymorphism were more predisposed to bacterial infections and hepatic encephalopathy than wild-type patients^[19]. One possible explanation for these findings is that the inflammatory response in patients with the *TLR4* D299G polymorphism differs from that in wild-type patients.

This study was designed to compare the cytokine production by peripheral blood cells from cirrhotic patients with *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms to the cytokine production in patients without these polymorphisms.

MATERIALS AND METHODS

Patients

From April 2006 to May 2011 we screened 258 consecutive hospitalized patients with cirrhosis and ascites and found *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms in 28 patients (11%). The present study was performed between February 2009 and July 2011 and included those patients with *TLR4* polymorphisms who survived free of liver transplant and fulfilled the inclusion and exclusion criteria. Patients with *TLR4* polymorphisms (polymorphism group) were matched for age, sex and degree of liver failure with cirrhotic patients without these polymorphisms (wild-type group). All the patients were Caucasian and cirrhosis was diagnosed by biopsy or from clinical, analytical and ultrasonographic findings. They all had decompensated cirrhosis as they had previously presented at least one decompensation.

All were outpatients coming to the hospital for follow-up visits or to the day hospital for therapeutic paracentesis. The exclusion criteria were human immunodeficiency virus infection or any other immunodeficiency, treatment with immunosuppressive or immunomodulatory drugs, hepatocellular carcinoma or other neoplasia, active alcohol intake in the previous year, liver transplantation, and active infection or any other decompensation of cirrhosis requiring hospitalization in the previous month.

At inclusion in the study, we recorded clinical and analytical data as well as previous decompensations of cirrhosis, with special emphasis on hepatic encephalopathy episodes, and we collected blood samples for laboratory analysis/assays.

A group of healthy Caucasian donors was also included to compare their cytokine production with that of patients with cirrhosis.

The study was a priori approved by the Clinical Research Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and conforms to the ethical guidelines of the Helsinki Declaration of 1975 (6th revision, 2008). All patients gave written consent to be included after receiving appropriate verbal and written information.

Samples

Whole blood samples were collected from healthy donors, patients from the polymorphism group (*TLR4* D299G and/or T399I) and wild-type patients. Samples were processed within one hour after collection and maintained at room temperature. For cytokine production analysis, blood was collected into BD Vacutainer® tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, United States) containing sodium-heparin. For the genomic DNA extraction, blood was collected into separate BD Vacutainer® tubes containing ethylene diamine tetra-acetic acid.

Genomic DNA extraction and *TLR4* and *TLR2* polymorphisms genotyping

Genomic DNA was extracted from buffy-coat fraction using QIAamp DNA blood minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA, United States). The sequencing primer used for *TLR4* Asp299Gly (D299G, rs4986790) was 5'-TG-GAATGCTGGAATCCAGA-3', and for Thr399Ile (T399I, rs4986791) was 5'-CTCTAGAGGGCCTGT-GCA-3'.

As *TLR2* polymorphisms can influence the cytokine production^[15,16], we assessed the presence of Arg753Gln (R753Q, rs5743708) and Arg677Trp (R677W) *TLR2* polymorphisms in our study population. The sequencing primer used for *TLR2* R753Q was 5'-GCCTACTGGGT-GGAGAACCT-3' and for R677W was 5'-GGCCACTC-CAGGTAGGTCCT-3'.

The polymerase chain reaction consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 34 cycles of 45 s at 95 °C, 30 s at 60 °C for *TLR4* and 61.2 °C for *TLR2*, 1 min at 72 °C, and a final extension of 5 min at 72 °C. Once the amplification was confirmed, sequencing was performed by Macrogen Inc, Korea using BigDye (Applied Biosystem) chemistry.

Lipopolysaccharide binding protein levels

Serum was tested for lipopolysaccharide binding protein (LBP) concentration to assess exposure to bacteria and their endotoxins as an index of bacterial translocation^[5], using specific ELISA (Biometec GmbH, Greifswald, Germany) according to the manufacturer's instructions. LBP was quantified with standard curves provided by the corresponding ELISA kit. The detection limit was 5 ng/mL.

Whole blood cell culture

Heparinized whole blood (2.5 mL) was cultured in 5 mL polypropylene tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, United States) with: (1) 1 mL of RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Cologne, Germany); (2) 650 µL of RPMI 1640 medium with 350 µL of ultrapure LPS (0.01 µg/mL) (Ultra pure lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111:B4 strain- *TLR4* ligand cat# tlr-pelps InvivoGen, San Diego, CA, United States); and (3) 350 µL of LTA (1 µg/mL) (Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*- *TLR2* ligand cat #tlr-psltal InvivoGen). The cultures were maintained at 37 °C with 5% CO₂ for 20 h.

Cytokine levels

Culture supernatants were tested for TNF- α , IL-10 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, United States) and IL-6 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) concentrations using specific ELISAs, according to the manufacturer's instructions. All cytokines were quantified with standard curves provided by the corresponding ELISA kit. The detection limits were: 30 pg/mL for TNF- α and IL-10, and 10 pg/mL for IL-6.

Statistical analysis

Comparisons between patients with cirrhosis and healthy donors and between patients with *TLR4* polymorphisms and wild-type patients were performed using Fisher's exact test for categorical variables and Mann-Whitney test for quantitative data. A two-sided *P* value < 0.05 was considered statistically significant. Data are expressed as frequencies or median (range).

RESULTS

Patient characteristics

From the 28 patients with *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms, 19 were not included for the following causes: 8 died before the present study was performed, 2 underwent liver transplantation, 6 were lost to follow-up, 2 developed hepatocellular carcinoma, and 1 had macroglobulinemia. Therefore, 9 patients with cirrhosis and *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms (polymorphism group) were included in the study and compared to 10 matched cirrhotic patients without these polymorphisms (wild-type group). Five healthy donors were also included.

In the polymorphism group, eight of the nine patients showed both *TLR4* D299G and T399I polymorphisms in heterozygosis, while the remaining patient showed only the T399I polymorphism in heterozygosis. Neither of the *TLR2* polymorphisms was detected in the polymorphism group nor in the wild-type group. No *TLR4* or *TLR2* polymorphisms were detected in any of the healthy donors.

Table 1 shows clinical and analytical characteristics of the two groups of patients. We did not find statistical differences in demographics, etiology of cirrhosis, degree of liver insufficiency, blood total leukocyte, monocyte and lymphocyte count, pharmacological treatment, or presence of ascites. There was a trend towards more patients on prophylaxis with norfloxacin in the polymorphism group.

The mean follow up from the time of the first decompensation of cirrhosis until inclusion in the study was 18.0 (4.5-97.0) months in the polymorphism group and 30.7 (2.5-59.5) in the wild-type group (*P* = 0.36). Table 2 shows the previous complications of cirrhosis during this period. There was a non-significant trend to a higher incidence of variceal bleeding and bacterial infections in the polymorphism group than in the wild-type group. The incidence of hepatic encephalopathy was higher in the

Table 1 Clinical and analytical characteristics of patients with TLR4 polymorphisms and wild-type patients *n* (%)

	Polymorphisms (<i>n</i> = 9)	Wild-type (<i>n</i> = 10)	<i>P</i> value
Age (yr)	63.2 (40-78)	61.0 (42-79)	0.93
Sex (male/female)	6 (67)/3 (33)	6 (60)/4 (40)	1.00
Etiology (alcohol/HCV/alcohol + HCV/other)	3 (33)/3 (33)/2 (22)/1 (11)	5 (50)/2 (20)/3 (30)/0 (0)	0.5
Child-Pugh score	7 (5-9)	6 (5-8)	0.49
MELD score	11 (6-16)	12 (6-18)	0.62
Serum bilirubin (μmol/L)	17.0 (7-41)	27.5 (9-60)	0.56
Serum albumin (g/L)	32.8 (22.7-49.4)	35.9 (30.0-43.9)	0.34
INR	1.10 (1.01-1.48)	1.22 (0.96-1.39)	0.68
Blood total leukocyte count (× 10 ⁹ /L)	5.89 (2.75-11.48)	5.67 (3.84-8.57)	0.93
Blood neutrophil count (× 10 ⁹ /L)	3.30 (2.00-7.78)	3.21 (1.61-5.63)	0.74
Blood monocyte count (× 10 ⁹ /L)	0.59 (0.20-0.98)	0.66 (0.38-1.00)	0.46
Blood lymphocyte count (× 10 ⁹ /L)	1.00 (0.38-2.15)	1.41 (0.35-2.22)	0.39
Present ascites	3 (33)	3 (30)	1.00
Diuretics	6 (67)	9 (90)	0.30
Beta-blockers	4 (44)	5 (50)	1.00
Norfloracin prophylaxis	5 (55)	4 (40)	0.65

HCV: Hepatitis C virus; MELD: Model for end-stage liver disease; INR: International normalized ratio.

Table 2 Data of previous complications of cirrhosis in patients with TLR4 polymorphisms and wild-type patients *n* (%)

	Polymorphisms (<i>n</i> = 9)	Wild-type (<i>n</i> = 10)	<i>P</i> value
Previous ascites	9 (100)	10 (100)	1.00
Previous variceal bleeding	4 (44)	2 (20)	0.35
Previous bacterial infections	8 (89)	5 (50)	0.14
Number of infections/patient	2.0 (0-4)	0.5 (0-5)	0.14
Previous SBP	5 (55)	3 (30)	0.37
Previous hepatic encephalopathy	7 (78)	2 (20)	0.02
Number of episodes of encephalopathy	17	8	
Number of episodes of encephalopathy/patient	1 (0-5)	0 (0-7)	0.03
Degree of encephalopathy (episodes) 1/2/3/4	5/9/1/2	3/4/0/1	
Degree of encephalopathy ¹	2.0 (1-4)	1.9 (1-4)	0.74

¹Median (range) of the degree of hepatic encephalopathy in patients with this complication. SBP: Spontaneous bacterial peritonitis.

polymorphism group than in the wild-type group (78% *vs* 20%, *P* = 0.02). Patients from the polymorphism group presented a higher number of hepatic encephalopathy episodes per patient than the wild-type group. Infection was the most frequent precipitating factor in the two groups: 8 episodes in the polymorphism group and 5 in the wild-type group. Other precipitating events were: diuretics (4 and 0 episodes), electrolyte disturbances (1 and 2), gastrointestinal bleeding (1 and 0), constipation (2 and 0), and benzodiazepine treatment (2 and 0). No precipitating events could be identified in 2 episodes from the polymorphism group and in 1 episode from the wild-type group.

LBP plasma levels

LBP plasma levels showed a trend to be higher in all patients with cirrhosis than in healthy donors [21.7 (2.2-49.7) μg/mL *vs* 9.3 (6.0-16.2) μg/mL, *P* = 0.28]. Patients with *TLR4* polymorphisms showed a trend to have higher LBP plasma levels than wild-type patients [29.4 (14.7-49.7) μg/mL *vs* 7.4 (2.2-32.9) μg/mL, *P* = 0.07].

Cytokine production

Table 3 shows cytokine production by peripheral blood

cells from healthy donors and all patients with cirrhosis. Spontaneous TNF-α and IL-6 production was significantly higher in patients with cirrhosis than in healthy donors. The cytokine production of TNF-α after LTA stimulation and IL-6 after LPS and LTA stimulation was significantly higher in patients with cirrhosis than in healthy donors.

Figure 1 shows spontaneous and stimulated cytokine production in the two groups of patients with cirrhosis. There was a non-significant trend for a lower TNF-α spontaneous production in the polymorphism group than in the wild-type group. Spontaneous production of IL-6 [888.7 (172.0-2119.3) pg/mL *vs* 5540.4 (1159.2-26053.9) pg/mL, *P* < 0.001] and IL-10 [28.7 (6.5-177.1) pg/mL *vs* 117.8 (6.5-318.1) pg/mL, *P* = 0.02] was lower in the polymorphism group than in the wild-type group. The cytokine production after stimulation with LPS and LTA was similar in the two groups. Therefore, the increase in stimulated cytokine production with respect to spontaneous cytokine production, expressed as fold change, was higher in the polymorphism group than in the wild-type group (Table 4).

Table 5 shows cytokine production by peripheral blood cells from patients without prophylactic norflorax-

Table 3 Spontaneous and stimulated cytokine production by peripheral blood cells in healthy donors and all patients with cirrhosis

	Healthy donors (n = 5)	All patients with cirrhosis (n = 19)	P value
Spontaneous TNF- α (pg/mL)	< 30	602.4 (96.1-3920.1)	0.001
TNF- α after LPS (pg/mL)	1693 (1185-3709)	2904 (931-5078)	0.150
TNF- α after LTA (pg/mL)	638.3 (49.7-1958)	2440 (241-4798)	0.006
Spontaneous IL-6 (pg/mL)	< 10	1537.8 (172.0-26053.9)	0.001
IL-6 after LPS (pg/mL)	20493 (19499-23042)	30219 (1362-32680)	0.006
IL-6 after LTA (pg/mL)	22157 (17390-27010)	30165 (3269-32707)	0.005
Spontaneous IL-10 (pg/mL)	< 30	43.6 (6.5-318.1)	0.210
IL-10 after LPS (pg/mL)	1309 (590.2-1578)	939.9 (120.8-2100)	0.890
IL-10 after LTA (pg/mL)	499.3 (268.7-816.9)	800.4 (80.72-2077)	0.150

TNF- α : Tumour necrosis factor-alpha; LPS: Lipopolysaccharide; LTA: Lipoteichoic acid; IL: Interleukin.

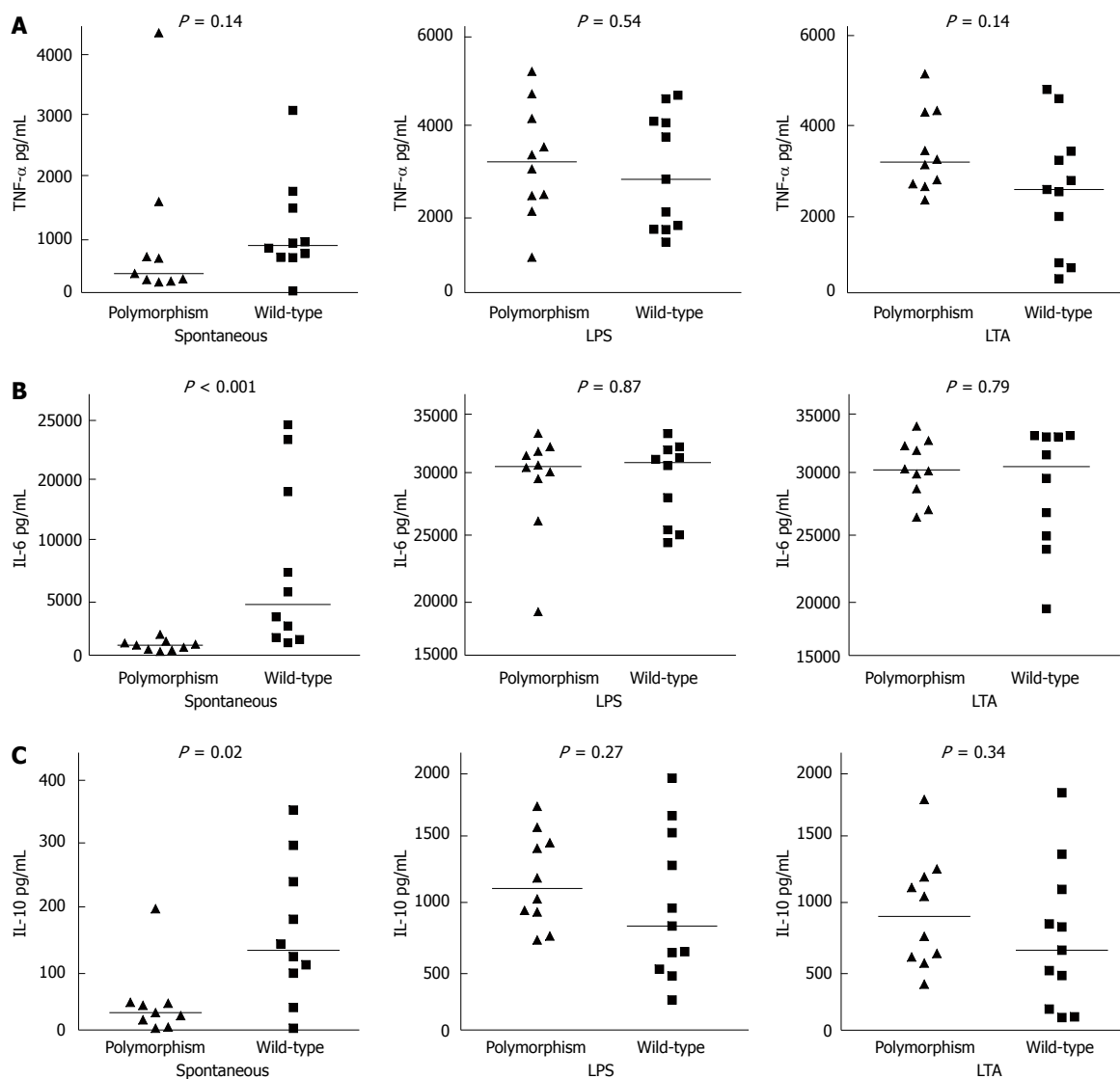


Figure 1 Cytokine production in patients with cirrhosis and TLR4 polymorphisms and wild-type patients. A: TNF- α concentration in supernatants of unstimulated and LPS and LTA stimulated peripheral blood cells; B: IL-6 concentration in supernatants of unstimulated and LPS and LTA stimulated peripheral blood cells; and C: IL-10 concentration in supernatants of unstimulated and LPS and LTA stimulated peripheral blood cells. TNF- α : Tumour necrosis factor-alpha; LPS: Lipopolysaccharide; LTA: Lipoteichoic acid; IL: Interleukin.

Table 4 Increment in cytokine production expressed as stimulated/spontaneous production fold change in patients with cirrhosis and *TLR4* polymorphisms and wild-type patients

	Polymorphisms (n = 9)	Wild-type (n = 10)	P value
Increment TNF- α after LPS	5.3 (1.0-17.4)	3.8 (1.1-17.0)	0.280
Increment TNF- α after LTA	6.5 (1.2-14.4)	2.7 (0.2-5.1)	0.040
Increment IL-6 after LPS	26.0 (14.7-189.9)	3.3 (1.1-17.0)	< 0.001
Increment IL-6 after LTA	35.2 (15.4-183.6)	3.0 (1.2-25.6)	< 0.001
Increment IL-10 after LPS	37.8 (9.3-185.1)	6.3 (0.5-143.9)	0.006
Increment IL-10 after LTA	32.0 (11.3-70.4)	3.7 (1.0-23.7)	0.002

TNF- α : tumour necrosis factor-alpha; LPS: lipopolysaccharide; LTA: lipoteichoic acid; IL: Interleukin.

Table 5 Spontaneous and stimulated cytokine production by peripheral blood cells in patients with cirrhosis not treated with norfloxacin

	Polymorphisms (n = 4)	Wild-type (n = 6)	P value
Spontaneous TNF- α (pg/mL)	464.3 (223.6-3920.1)	813.1 (591-1573)	0.25
TNF- α after LPS (pg/mL)	3166 (931.8-5078)	2936 (1272-4547)	0.76
TNF- α after LTA (pg/mL)	2766 (2291-4798)	1927 (241.3-4455)	0.17
Spontaneous IL-6 (pg/mL)	699.4 (320.8-1145.6)	5540 (1538-26053.9)	< 0.001
IL-6 after LPS (pg/mL)	27880 (19100-30070)	29000 (24960-32670)	0.47
IL-6 after LTA (pg/mL)	29660 (27970-30290)	29860 (3269-32170)	1.00
Spontaneous IL-10 (pg/mL)	13.2 (6.5-39.1)	135.6 (36.2-318.1)	0.02
IL-10 after LPS (pg/mL)	949.5 (655-1474)	1467 (334.5-2100)	0.35
IL-10 after LTA (pg/mL)	606.8 (376-1234)	897.6 (86.66-1530)	0.91

TNF- α : tumour necrosis factor-alpha; LPS: lipopolysaccharide; LTA: lipoteichoic acid; IL: Interleukin.

cin. The differences in the cytokine production between patients with *TLR4* polymorphisms and wild-type patients in this subgroup were similar to those observed in the whole series.

DISCUSSION

The main finding in the present study is that peripheral blood cells from patients with cirrhosis and *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms spontaneously produced lower levels of IL-6 and IL-10 than wild type patients but showed a similar IL-6, TNF- α and IL-10 production after stimulation.

Patients with cirrhosis presented a higher spontaneous production of pro-inflammatory cytokines than healthy donors. This finding agrees with the pro-inflammatory state described in cirrhosis^[5,6], thought to be mainly related to bacterial translocation and increased plasma endotoxin^[1,2,4,6]. When continuously exposed to endotoxin, the immune system can develop tolerance, leading to blunted cytokine production after stimulation^[21-23]. However, our results do not support this hypothesis because we observed a higher pro-inflammatory cytokine production after LPS and LTA stimulation in patients with cirrhosis than in controls. A higher pro-inflammatory cytokine production after LPS stimulation has also been observed previously in patients with cirrhosis^[24] and in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis^[25].

Despite similar clinical and analytical characteristics, patients with cirrhosis and *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms showed lower IL-6 spontaneous produc-

tion than wild-type patients. In the setting of cirrhosis and increased endotoxemia, this finding could be the consequence of a decrease in the cellular responsiveness to endotoxin associated with these *TLR4* polymorphisms, as observed in other populations^[16,26]. Such impaired responsiveness could lead to a defective clearance of the increased plasma endotoxin, which in turn would enhance synthesis of LBP, an index of long-term exposure to endotoxin^[5]. Moreover, increased LBP could further decrease the synthesis of IL-6^[27]. In support of this hypothesis, we observed a trend for higher LBP plasma levels in patients with *TLR4* polymorphisms than in wild-type patients. However, when peripheral blood cells were stimulated with high concentrations of LPS or LTA, patients with cirrhosis and *TLR4* polymorphisms and wild type-patients showed a similar cytokine production. Our findings are in keeping with previous data showing that the functional consequences of *TLR4* polymorphisms are more evident at low agonist concentrations than at high agonist concentrations^[28]. Changes in the anti-inflammatory cytokine IL-10 paralleled those observed in IL-6 and can be explained as a compensatory mechanism to attenuate the effects of this pro-inflammatory cytokine^[23].

Previous studies in non-cirrhotic populations have reported contradictory results about the relationship between *TLR4* D299G and T399I polymorphisms and immune response^[15,16,18,26,29-32], as hypo-^[16,26], normo-^[29-32] and also hyper-responsiveness^[29] have all been associated with these polymorphisms. These contradictory findings can be attributed to differences between the studies, such as the characteristics and status of patients or cells evalu-

ated, stimulation protocols and the doses of ligands used, and interactions between several coincident polymorphisms^[15,18,28,29]. For example, in the Dogon population, the *TLR4* D299G polymorphism is usually observed without the T399I polymorphism, and it has been associated with a higher TNF- α production after LPS stimulation than in wild-type individuals^[29]. In Caucasians, however, the D299G polymorphism is almost always associated with the T399I polymorphism, and these two polymorphisms are associated with a TNF- α production after LPS stimulation that is similar to that in wild-type individuals^[29]. To our knowledge, no studies have previously evaluated the influence of *TLR4* D299G or T399I polymorphisms on peripheral blood cell function in the complex immunological setting of patients with cirrhosis.

Antibiotic treatment can influence the function of immune cells by decreasing bacterial translocation^[5,22,33]. To avoid this confounding factor, we further analyzed patients without prophylactic norfloxacin separately. We found that patients with *TLR4* polymorphisms presented lower spontaneous IL-6 production than wild-type patients, as observed in the whole series.

The influence of genetic factors in the evolution of patients with liver diseases is currently gaining interest^[19,20,34-36]. The different cytokine production profile observed in our patients could help to explain some associations between *TLR4* polymorphisms and the development of complications in cirrhosis. The lower spontaneous pro-inflammatory cytokine production in our study reflects a less marked basal pro-inflammatory state *in vivo* in patients with *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms than in wild-type patients. This finding could be related to the predisposition of patients with these *TLR4* polymorphisms to develop bacterial infections^[14,15,19], but it could also explain the protective effect of *TLR4* polymorphisms against progression of liver disease^[19,20]. The inflammatory response has been increasingly implicated in the development of hepatic encephalopathy, and it is now considered that inflammation acts synergistically with ammonia toxicity in the pathogenesis of this complication^[9-11]. Moreover, as we also observed in the present study, infection is a main triggering factor of hepatic encephalopathy^[9-11]. The different cytokine production profile observed in our study suggests that cirrhotic patients with *TLR4* polymorphisms may show *in vivo* a greater difference between basal and stimulated (*i.e.* during bacterial infection^[1-5,37]) cytokine production than wild-type patients. This higher cytokine production gradient in *TLR4* polymorphisms patients could be related to their predisposition to develop hepatic encephalopathy, as has been observed here and in a previous study with a higher number of patients^[19].

Our study has certain limitations. The first is the small number of patients studied and their heterogeneity, as etiologies of cirrhosis were diverse and some patients were on norfloxacin treatment. It was difficult to recruit a larger, more homogeneous series of patients because the prevalence of *TLR4* D299G and T399I polymorphisms

is only about 10% of the population^[14,15,19]. Besides, we found that our results were similar when we analyzed only patients without antibiotic treatment. Furthermore, the etiology was related to alcohol and/or hepatitis C virus in most patients in both groups. Previous studies have shown that the presence of hepatitis C virus appears to have no relevant effects on the cytokine production evaluated in the present study^[38,39]. A second limitation is that we determined cytokine production in whole blood cell cultures. This is a physiological model to study the overall peripheral immune response *ex vivo*^[29,31,40], but it is unable to identify the subsets of cells responsible for the different cytokine production profile. And third, the relationship between a higher cytokine production gradient and the development of hepatic encephalopathy in patients with *TLR4* polymorphisms is only speculative because no data were available on cytokine production during hepatic encephalopathy episodes.

In conclusion, spontaneous IL-6 and IL-10 production was lower in patients with cirrhosis and *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms than in wild-type patients. Furthermore, the production of IL-6, TNF- α and IL-10 after TLR stimulation was similar in patients with *TLR4* polymorphisms and in wild-type patients. This different pattern of cytokine production could play a role in the development of complications, such as hepatic encephalopathy, in patients with these polymorphisms.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Carolyn Newey for English language assistance. This study was performed within the PhD immunology program at Universitat Autònoma de Barcelona.

COMMENTS

Background

Due to bacterial translocation and several alterations in the immune response, patients with cirrhosis are predisposed to develop infections caused by enteric bacteria. Pathogen-associated molecular patterns in these bacteria are usually recognized by transmembrane receptors (TLRs) found mainly on the surface of leukocytes. When this occurs, TLRs trigger the innate inflammatory response. The authors previously observed that cirrhotic patients with the *TLR4* D299G polymorphism were more predisposed to bacterial infections and hepatic encephalopathy than wild-type patients. One possible explanation for these findings is that the inflammatory response in patients with the *TLR4* D299G polymorphism differs from that in wild-type patients.

Research frontiers

The influence of genetic factors in the evolution of patients with liver diseases is currently gaining interest. The profile of the innate immune response in patients with *TLR* polymorphisms could help to explain the development of complications in cirrhosis.

Related publications

Guamer-Argente C, Sanchez E, Vidal S, Roman E, Concepcion M, Poca M, Sanchez D, Juarez C, Soriano G, Guamer C. Toll-like receptor 4 D299G polymorphism and the incidence of infections in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31(11): 1192-1199

Innovations and breakthroughs

No studies have previously evaluated the influence of *TLR4* polymorphisms on peripheral blood cell function in the complex immunological setting of patients with cirrhosis. Cirrhotic patients with *TLR4* D299G and/or T399I polymorphisms showed a less marked basal pro-inflammatory state than wild-type patients,

predisposing them to develop bacterial infections. Cirrhotic patients with these *TLR4* polymorphisms showed a higher difference between basal and bacteria stimulated cytokine production than wild-type patients. Since infection is a main triggering factor of hepatic encephalopathy, this higher cytokine production gradient in patients with these polymorphisms could be related to their predisposition to develop this cirrhotic complication.

Applications

The main application is the identification of predisposing biomarkers for cirrhotic complications: bacterial infections and hepatic encephalopathy.

Terminology

Bacterial translocation is defined as the passage of bacteria or their products from the intestinal lumen to extraintestinal sites, such as mesenteric lymph nodes. Hepatic encephalopathy is the occurrence of confusion, altered level of consciousness and coma as a result of liver failure.

Peer review

The studies presented the data on the cytokine [interleukin (IL)-6 and IL-10] and tumor necrosis factor production by peripheral blood cells from cirrhotic patients with and without *TLR4/D299G* and/or *T399I* polymorphism. The cytokine production was assessed before and after lipopolysaccharide and lipoteichoic acid stimulation. Based on the presented data the authors suggest that the presence of *TLR4/D299G* and/or *T399I* polymorphism may be associated with a distinct pattern of cytokine production in patients with cirrhosis and, hence could be responsible for the development of complications. This is quite informative, well written, and relatively well presented study. However, there are several omissions that detract the reader.

REFERENCES

- 1 **Bellot P**, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int* 2013; **33**: 31-39 [PMID: 23121656 DOI: 10.1111/liv.12021]
- 2 **Guarner C**, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; **17**: 27-31 [PMID: 15647636]
- 3 **Mencin A**, Kluwe J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut* 2009; **58**: 704-720 [PMID: 19359436 DOI: 10.1136/gut.2008.156307]
- 4 **Francés R**, Zapater P, González-Navajas JM, Muñoz C, Caño R, Moreu R, Pascual S, Bellot P, Pérez-Mateo M, Such J. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008; **47**: 978-985 [PMID: 18306221 DOI: 10.1002/hep.22083]
- 5 **Albillos A**, de la Hera A, González M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, Alvarez-Mon M. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003; **37**: 208-217 [PMID: 12500206 DOI: 10.1053/jhep.2003.50038]
- 6 **Tazi KA**, Quicoi JJ, Abdel-Razek W, Tellier Z, Guichard C, Ogier-Denis E, Lebrec D, Moreau R. Protein array technology to investigate cytokine production by monocytes from patients with advanced alcoholic cirrhosis: An ex vivo pilot study. *Hepatol Res* 2009; **39**: 706-715 [PMID: 19473436 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2009.00498.x]
- 7 **Cervoni JP**, Thévenot T, Weil D, Muel E, Barbot O, Sheppard F, Monnet E, Di Martino V. C-reactive protein predicts short-term mortality in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2012; **56**: 1299-1304 [PMID: 22314431 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.12.030]
- 8 **Zapater P**, Francés R, González-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, Monfort D, Montoliu S, Vila C, Escudero A, Torras X, Cirera I, Llanos L, Guarner-Argente C, Palazón JM, Carnicer F, Bellot P, Guarner C, Planas R, Solá R, Serra MA, Muñoz C, Pérez-Mateo M, Such J. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology* 2008; **48**: 1924-1931 [PMID: 19003911 DOI: 10.1002/hep.22564]
- 9 **Córdoba J**, Mínguez B. Hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 2008; **28**: 70-80 [PMID: 18293278 DOI: 10.1055/s-2008-1040322]
- 10 **Butterworth RF**. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* 2011; **53**: 1372-1376 [PMID: 21480337 DOI: 10.1002/hep.24228]
- 11 **Shawcross DL**, Shabbir SS, Taylor NJ, Hughes RD. Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2010; **51**: 1062-1069 [PMID: 19890967 DOI: 10.1002/hep.23367]
- 12 **Knapp S**, von Aulock S, Leendertse M, Haslinger I, Draing C, Golenbock DT, van der Poll T. Lipoteichoic acid-induced lung inflammation depends on TLR2 and the concerted action of TLR4 and the platelet-activating factor receptor. *J Immunol* 2008; **180**: 3478-3484 [PMID: 18292574]
- 13 **Good DW**, George T, Watts BA. Toll-like receptor 2 is required for LPS-induced Toll-like receptor 4 signaling and inhibition of ion transport in renal thick ascending limb. *J Biol Chem* 2012; **287**: 20208-20220 [PMID: 22523073 DOI: 10.1074/jbc.M111.336255]
- 14 **Schröder NW**, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**: 156-164 [PMID: 15766650 DOI: 10.1016/S1473-3099(05)01308-3]
- 15 **Misch EA**, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci (Lond)* 2008; **114**: 347-360 [PMID: 18230059 DOI: 10.1042/CS20070214]
- 16 **Arbour NC**, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; **25**: 187-191 [PMID: 10835634 DOI: 10.1038/76048]
- 17 **Rallabhandi P**, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditì M, Hemming VG, Blanco JC, Segal DM, Vogel SN. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* 2006; **177**: 322-332 [PMID: 16785528]
- 18 **Ferwerda B**, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, Van der Meer JW, Netea MG. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med* 2008; **14**: 346-352 [PMID: 18231573 DOI: 10.2119/2007-00135.Ferwerda]
- 19 **Guarner-Argente C**, Sánchez E, Vidal S, Román E, Concepción M, Poca M, Sánchez D, Juárez C, Soriano G, Guarner C. Toll-like receptor 4 D299G polymorphism and the incidence of infections in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; **31**: 1192-1199 [PMID: 20222908 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04291.x]
- 20 **Huang H**, Shiffman ML, Friedman S, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, Rowland CM, Catanese JJ, Leong DU, Sninsky JJ, Layden TJ, Wright TL, White T, Cheung RC. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; **46**: 297-306 [PMID: 17461418 DOI: 10.1002/hep.21695]
- 21 **Francés R**, Rodríguez E, Muñoz C, Zapater P, De la ML, Ndongo M, Pérez-Mateo M, Such J. Intracellular cytokine expression in peritoneal monocyte/macrophages obtained from patients with cirrhosis and presence of bacterial DNA. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; **17**: 45-51 [PMID: 15647640]
- 22 **Testro AG**, Gow PJ, Angus PW, Wongseelashote S, Skinner N, Markovska V, Visvanathan K. Effects of antibiotics on expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 on mononuclear cells in patients with advanced cirrhosis. *J Hepatol* 2010; **52**: 199-205 [PMID: 20006396 DOI: 10.1016/j.jhep.2009.11.006]
- 23 **Lin CY**, Tsai IF, Ho YP, Huang CT, Lin YC, Lin CJ, Tseng SC, Lin WP, Chen WT, Sheen IS. Endotoxemia contributes to the immune paralysis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2007; **46**: 816-826 [PMID: 17328986 DOI: 10.1016/j.jhep.2006.12.018]
- 24 **Devière J**, Content J, Denys C, Vandebussche P, Schandene L, Wybran J, Dupont E. Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 1990; **11**: 628-634 [PMID: 2184115]

- 25 **Ramírez MJ**, Ibáñez A, Navasa M, Casals E, Morales-Ruiz M, Jiménez W, Arroyo V, Rodés J. High-density lipoproteins reduce the effect of endotoxin on cytokine production and systemic hemodynamics in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 2004; **40**: 424-430 [PMID: 15123356 DOI: 10.1016/j.jhep.2003.11.017]
- 26 **Montes AH**, Asensi V, Alvarez V, Valle E, Ocaña MG, Meana A, Carton JA, Paz J, Fierer J, Celada A. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2006; **143**: 404-413 [PMID: 16487238 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.03002.x]
- 27 **Mueller M**, Stamme C, Draing C, Hartung T, Seydel U, Schromm AB. Cell activation of human macrophages by lipoteichoic acid is strongly attenuated by lipopolysaccharide-binding protein. *J Biol Chem* 2006; **281**: 31448-31456 [PMID: 16928689 DOI: 10.1074/jbc.M605966200]
- 28 **Prohinar P**, Rallabhandi P, Weiss JP, Gioannini TL. Expression of functional D299G.T399I polymorphic variant of TLR4 depends more on coexpression of MD-2 than does wild-type TLR4. *J Immunol* 2010; **184**: 4362-4367 [PMID: 20212095 DOI: 10.4049/jimmunol.0903142]
- 29 **Ferwerda B**, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermsen CC, Stalenoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rúa C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW, Netea MG. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 16645-16650 [PMID: 17925445 DOI: 10.1073/pnas.0704828104]
- 30 **Erridge C**, Stewart J, Poxton IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling. *J Exp Med* 2003; **197**: 1787-1791 [PMID: 12796470 DOI: 10.1084/jem.20022078]
- 31 **von Aulock S**, Schröder NW, Gueinzus K, Traub S, Hoffmann S, Graf K, Dimmeler S, Hartung T, Schumann RR, Hermann C. Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood. *J Infect Dis* 2003; **188**: 938-943 [PMID: 12964127 DOI: 10.1086/378095]
- 32 **van der Graaf C**, Kullberg BJ, Joosten L, Verver-Jansen T, Jacobs L, Van der Meer JW, Netea MG. Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. *Cytokine* 2005; **30**: 264-268 [PMID: 15927851 DOI: 10.1016/j.cyto.2005.02.001]
- 33 **Zapater P**, Caño R, Llanos L, Ruiz-Alcaraz AJ, Pascual S, Barquero C, Moreu R, Bellot P, Horga JF, Muñoz C, Pérez J, García-Peñarrubia P, Pérez-Mateo M, Such J, Francés R. Norfloxacin modulates the inflammatory response and directly affects neutrophils in patients with decompensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2009; **137**: 1669-79.e1 [PMID: 19660462 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.07.058]
- 34 **Appenrodt B**, Grünhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology* 2010; **51**: 1327-1333 [PMID: 20087966 DOI: 10.1002/hep.23440]
- 35 **Romero-Gómez M**, Jover M, Del Campo JA, Royo JL, Hoyas E, Galán JJ, Montoliu C, Baccaro E, Guevara M, Córdoba J, Soriano G, Navarro JM, Martínez-Sierra C, Grande L, Galindo A, Mira E, Mañes S, Ruiz A. Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a cohort study. *Ann Intern Med* 2010; **153**: 281-288 [PMID: 20820037 DOI: 10.7326/0003-4819-153-5-201009070-00002]
- 36 **Minmin S**, Xiaoqian X, Hao C, Baiyong S, Xiaxing D, Junjie X, Xi Z, Jianquan Z, Songyao J. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 decrease the risk of development of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2011; **6**: e19466 [PMID: 21559380 DOI: 10.1371/journal.pone.0019466]
- 37 **Navasa M**, Follo A, Filella X, Jiménez W, Francitorra A, Planas R, Rimola A, Arroyo V, Rodés J. Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* 1998; **27**: 1227-1232 [PMID: 9581675 DOI: 10.1002/hep.510270507]
- 38 **Riordan SM**, Skinner N, Nagree A, McCallum H, McIver CJ, Kurtovic J, Hamilton JA, Bengmark S, Williams R, Visvanathan K. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology* 2003; **37**: 1154-1164 [PMID: 12717397 DOI: 10.1053/jhep.2003.50180]
- 39 **Peng C**, Liu BS, de Knecht RJ, Janssen HL, Boonstra A. The response to TLR ligation of human CD16⁺CD14⁺ monocytes is weakly modulated as a consequence of persistent infection with the hepatitis C virus. *Mol Immunol* 2011; **48**: 1505-1511 [PMID: 21531464 DOI: 10.1016/j.molimm.2011.04.008]
- 40 **von Baehr V**, Döcke WD, Plauth M, Liebenthal C, Küpferling S, Lochs H, Baumgarten R, Volk HD. Mechanisms of endotoxin tolerance in patients with alcoholic liver cirrhosis: role of interleukin 10, interleukin 1 receptor antagonist, and soluble tumour necrosis factor receptors as well as effector cell desensitisation. *Gut* 2000; **47**: 281-287 [PMID: 10896923]

P- Reviewer: Slomiany BL **S- Editor:** Ma YJ **L- Editor:** A
E- Editor: Ma S

Impaired innate immune response of leukocytes from ascitic fluid of patients with spontaneous bacterial peritonitis

Juan Camilo Nieto,^{*,†,‡} Elisabet Sánchez,^{†,‡,§,¶} Cristina Romero,[§] Eva Román,^{†,‡,§,¶} Maria Poca,^{†,§} Carlos Guarner,^{†,‡,§,¶} Cándido Juárez,^{*,†,‡} Germán Soriano,^{†,‡,§,¶} and Silvia Vidal^{*,†,‡,¶}

*Department of Immunology and [§]Liver Section, Department of Gastroenterology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; [†]Institut de Recerca IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain; [‡]Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain; and [¶]Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

RECEIVED MARCH 15, 2015; REVISED JUNE 9, 2015; ACCEPTED JUNE 23, 2015. DOI: 10.1189/jlb.3AB0315-106R

ABSTRACT

An ascitic microenvironment can condition the immune response of cells from cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. To characterize this response, we determined the cytokine concentrations in ascitic fluid and analyzed the phenotype and function of ascitic leukocytes at diagnosis and after antibiotic-induced resolution in sterile ascites and ascitic fluid of 2 spontaneous bacterial peritonitis variants: positive and negative bacteriological culture. At diagnosis, a high concentration was found of IL-6 and IL-10 in the ascitic fluid from negative and positive bacteriological culture. The IL-6 concentration correlated with the percentage of neutrophils ($R = 0.686$, $P < 0.001$). In this context, positive and negative culture neutrophils had an impaired oxidative burst, and, after the antibiotic, the negative culture spontaneous bacterial peritonitis burst was fully recovered. Higher concentrations of IL-6 and IL-10 correlated with the presence of low granular CD14^{low} macrophages ($R = -0.436$, $P = 0.005$ and $R = 0.414$, $P = 0.007$, respectively). Positive culture spontaneous bacterial peritonitis macrophages expressed the lowest levels of CD16, CD86, CD11b and CD206, and HLA-DR, suggesting an impaired global function. Treatment increased all markers on the positive culture macrophages and CD11b and CD86 on negative culture macrophages. In negative culture spontaneous bacterial peritonitis, this increase was accompanied by phagocytic function recovery. The antibiotics then reverted the marker levels on positive and negative culture macrophages to the levels on sterile ascitis macrophages and restored ascitic negative culture cell function. *J. Leukoc. Biol.* 98: 000-000; 2015.

Abbreviations: CD = cluster of differentiation, HCV = hepatitis C virus, MFI = mean fluorescence intensity, NegC-SBP = negative culture spontaneous bacterial peritonitis, PMN = polymorphonuclear leukocyte, PosC-SBP = positive culture spontaneous bacterial peritonitis, SA = sterile ascitis, SBP = spontaneous bacterial peritonitis, SSC = side scatter channel

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

Introduction

SBP is among the most severe complications arising in patients with cirrhosis [1]. SBP originates when viable bacteria cross the intestinal wall in a process known as bacterial translocation. After crossing the intestinal wall, bacteria reach the mesenteric lymph nodes and enter the systemic circulation and ascitic fluid [2].

SBP is an infection of initially sterile ascitic fluid. SA is defined when the neutrophil counts are <250 cells/mm³ and the bacteriological culture is negative at the moment of paracentesis. Peritoneal infection causes an inflammatory reaction that increases the number of PMNs in ascitic fluid. Two criteria are required for a PosC-SBP diagnosis: the number of PMNs in the ascitic fluid must exceed 250 cells/mm³ and a germ must be isolated from the bacteriological cultures [3]. Approximately 50% of patients with >250 PMNs/mm³ will have a negative culture [4]. This situation is known as NegC-SBP. Because NegC-SBP and PosC-SBP have similar clinical and prognostic characteristics, the current treatments for both diagnoses are identical [1].

SBP resolution is associated with the disappearance of systemic and local symptoms and signs of infection: a reduction of the PMN count in the ascitic fluid (<250 cells/mm³) and a negative ascitic fluid culture. When the infection is not resolved, the mortality rate is high [5, 6]. An assessment of the immune response during the course of the infection will help recognize treatment failure as early as possible.

We hypothesized that the immune response during SBP is created by soluble inflammatory mediators present in the ascitic fluid of patients with cirrhosis. Altered soluble mediators could then be associated with a characteristic inflammatory response induced by ascitic neutrophils and macrophages. This response is initiated after the recognition of pathogens through TLRs and mostly consists of phagocytosis and an oxidative burst. TLR

1. Corresponding: Department of Immunology, Institut de Recerca IIB-Sant Pau, Avda Antoni M. Claret, 167 (pavelló 17), Barcelona 08025, Spain. E-mail: svidal@santpau.cat

activation then triggers the release of inflammatory mediators, including IL-1, IL-6, IL-12, IL-10, and TNF- α [7, 8]. Accordingly, the potential role of innate immune cells in SBP can be determined by examining the cellular phenotype, function capability, and cytokine response profile at the moment of bacterial infection. It has been reported that in the presence of bacterial DNA, peritoneal macrophages synthesize higher amounts of NO than macrophages without bacterial DNA. In addition, the presence of bacterial DNA has been associated with a marked activation of cytokine synthesis implicated in the inflammatory immune response and poor clinical outcomes [9, 10].

In the present study, we compared the inflammatory content in the ascites of patients with SA, PosC-SBP, and NegC-SBP. For this purpose, we first analyzed TNF- α , IL-6, and IL-10 levels. We then studied the association of each cytokine level with the cellular composition and function. Finally, we analyzed the expression of surface markers on macrophages in the ascitic fluid. Macrophage markers were selected according to their contribution to innate immune mechanisms such as antigen presentation (HLA-DR), phagocytosis (CD64, CD163), scavenger function (CD36, CD163), and activation (CD86, CD11b) [11, 12]. Because the immune response of patients with SBP after treatment is still poorly understood, we compared the phagocytosis, oxidative burst, and marker expression of ascitic monocytes in PosC-SBP and NegC-SBP before and after antibiotic treatment.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We collected ascitic fluid samples by paracentesis from 19 cirrhotic patients with SBP. SA fluid was collected from 9 patients who had cirrhosis and refractory ascites requiring paracentesis. SA was diagnosed when the ascitic PMN count was <250 cells/mm³ and the bacterial culture was negative. SBP was diagnosed when the ascitic PMN count was ≥ 250 cells/mm³ and the bacterial culture was positive or negative (PosC-SBP or NegC-SBP, respectively). The ascitic fluid from SBP patients was collected at admission and on the fifth day of antibiotic treatment. The ethics committee at the institution approved the study protocol, and all patients provided written informed consent to be included in the present study.

Cell isolation from ascitic fluid samples and flow cytometry analysis

The ascitic fluid samples (10 ml) from patients with SA, NegC-SBP, or PosC-SBP were centrifuged at 2000 rpm for 10 min, and the supernatants were frozen for cytokine detection. The cells were collected from the pellet, washed with PBS, and counted for the phenotyping and functional assays. For flow cytometry analysis, 0.5×10^6 cells were stained in 100 μ l with anti-CD14 PE-Dy647 and anti-CD16 FITC (ImmunoTools, Friesoythe, Germany), anti-CD11b, anti-CD86, anti-CD36 PE, anti-CD163 PE, anti-CD206, and anti-CD64 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) or the respective isotype control. The red blood cells were then lysed, and the white blood cells were fixed using the TQ-Prep System (Coulter Corp., Miami, FL, USA) to be analyzed by flow cytometry. The granularity (SSC) and the surface expression of the markers were analyzed on ascitic CD14⁺ macrophages. Analyses were performed on a Beckman Coulter FC500 cytometer (Beckman Coulter, Jersey City, NJ, USA). The percentage of positive CD16, CD163, and CD206 cells (percentage of cells) and the MFI of CD14, CD64,

CD86, CD11b, HLA-DR, and CD36 were calculated using CXP Analysis software, version 2.2 (Beckman Coulter).

Production of reactive oxidants

To determine the percentage of neutrophils or monocytes that produce reactive oxidants, 10^5 ascitic fluid cells were incubated for 20 min either with 200 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or without stimulus at 37°C. The formation of reactive oxidants was monitored by the oxidation of dihydrorhodamine 123 (Sigma-Aldrich) to rhodamine by flow cytometry (MFI).

Phagocytosis assay

Phagocytosis was measured using FITC-labeled *Escherichia coli* bacteria (K-12 strain) BioParticles, Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen, Eugene, OR, USA). In brief, 2×10^5 cells from ascitic fluid were mixed with 20 μ l of FITC-labeled *E. coli* bacteria (1×10^7) at 37°C for 2 h. To identify the macrophages, the cells were stained with anti-CD14-PE-Dy647. Phagocytosis was expressed as the MFI of FITC, corresponding to the number of labeled bacteria engulfed by a single cell.

Cytokine and total NO levels

Ascitic fluid samples were tested for TNF- α , IL-10 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), IL-6 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany), and total NO concentrations (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) using specific ELISAs. The limits of detection were 30 pg/ml for TNF- α and IL-10, 10 pg/ml for IL-6, and 3.2 μ M for total NO.

Statistical analysis

Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney *U* test for unpaired data and the Wilcoxon test for paired data. The correlations were analyzed using the Spearman test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The data are expressed as the mean \pm standard error of the mean.

RESULTS AND DISCUSSION

Cytokine and NO levels in ascitic fluid from PosC-SBP, NegC-SBP, and SA patients

We analyzed the concentration of IL-10, IL-6, and TNF- α in the ascitic fluid of PosC-SBP and NegC-SBP patients before and after treatment and SA patients (Fig. 1). No significant differences were seen in the TNF- α levels among the 3 groups of patients at diagnosis (PosC-SBP 39.65 \pm 6.05 pg/ml; NegC-SBP 35.40 \pm 7.81 pg/ml; SA 37.87 \pm 7.46 pg/ml). After treatment, the TNF- α levels tended to decrease in NegC-SBP and were significantly reduced in PosC-SBP (PosC-SBP 25.27 \pm 7.25 pg/ml, $P = 0.02$; NegC-SBP 30.05 \pm 7.85 pg/ml). Before treatment, the IL-6 levels in PosC-SBP and NegC-SBP were expectedly higher than those in SA (PosC-SBP 17,608 \pm 3123 pg/ml; NegC-SBP 10,165 \pm 2084; SA 2068 \pm 586 pg/ml; PosC-SBP vs. SA, $P < 0.001$; NegC-SBP vs. SA, $P = 0.002$). SBP has already been associated with an elevated production of inflammatory mediators in several reports [13]. Consequently, the elevated levels of IL-6 and its mediators have been considered markers for the diagnosis of SBP and the outcome of the disease [14, 15]. After treatment, the IL-6 levels had diminished in PosC-SBP and NegC-SBP, reaching levels similar to those of SA (after treatment PosC-SBP 2547 \pm 738 pg/ml; after treatment NegC-SBP 3764 \pm 1871 pg/ml; before vs. after treatment PosC-SBP, $P = 0.001$ and NegC-SBP, $P = 0.01$).

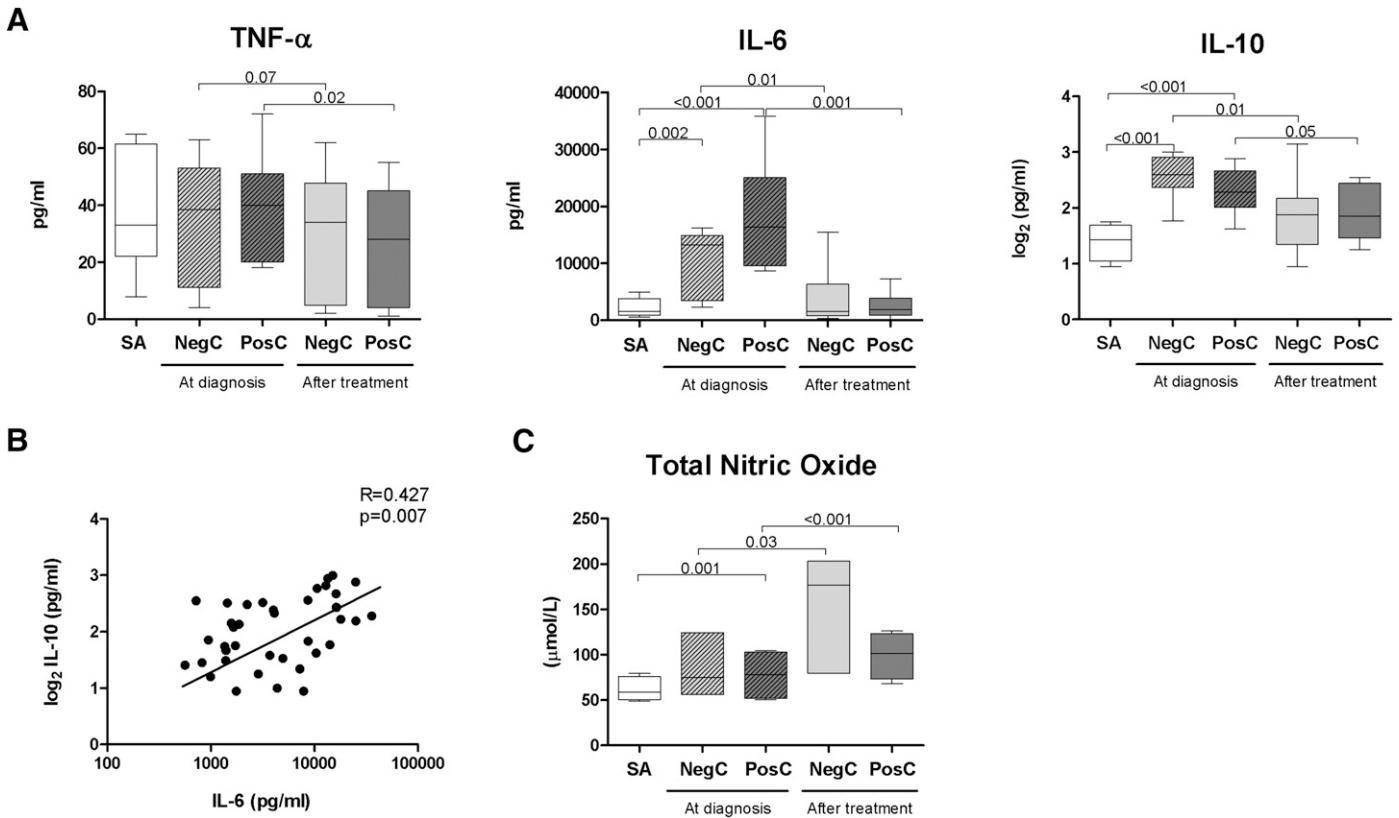


Figure 1. Cytokine levels and NO in the ascitic fluid. The levels of TNF- α , IL-6, IL-10, and total NO in ascitic fluid of cirrhotic patients with sterile ascites (SA, $n = 9$), NegC-SBP ($n = 8$), and PosC-SBP ($n = 11$) at diagnosis and after antibiotic treatment were quantified by ELISA. The Mann-Whitney U test was used for comparisons between the SA and 2 SBP groups and the Wilcoxon test for the comparisons between the same group before and after treatment. Correlation between cytokine levels was analyzed using the Spearman test.

At diagnosis, the IL-10 levels were significantly higher in PosC-SBP and NegC-SBP than in SA [PosC-SBP 2.30 ± 0.13 , NegC-SBP 2.56 ± 0.14 , SA 1.37 ± 0.10 log(pg/ml); PosC-SBP vs. SA, $P < 0.001$; NegC-SBP vs. SA, $P < 0.001$]. They had diminished in both groups after treatment [PosC-SBP 1.91 ± 0.16 , NegC-SBP 1.87 ± 0.23 log(pg/ml); before vs. after treatment PosC-SBP, $P = 0.05$; before vs. after treatment NegC-SBP, $P = 0.01$].

The IL-10 and IL-6 levels correlated positively ($R = 0.427$, $P = 0.007$; Fig. 1B) This correlation could be the consequence of the IL-10 induction by IL-6 [16]. Elevated levels of both cytokines have been previously described in patients with noninfected ascites and with SBP [17]. In patients with chronic hepatitis C, the serum levels of both cytokines have been correlated with the histopathological damage to the liver [18].

As expected, the NO levels in the ascitic fluid were significantly higher in PosC-SBP than in SA at diagnosis (SA 62.29 ± 5.86 vs. PosC-SBP 77.8 ± 9.1 μ M; $P = 0.001$; NegC-SBP 85.2 ± 12.8 μ M). After antibiotic treatment, the NO concentration had increased significantly in both PosC-SBP and NegC-SBP (PosC-SBP 99.37 ± 8.5 μ M; NegC-SBP 153 ± 23.7 μ M; $P < 0.001$ and $P = 0.03$, respectively; Fig. 1C).

Association of IL-6 levels with neutrophil presence

The IL-6 levels correlated significantly with the percentage of neutrophils in the ascitic fluid ($R = 0.686$, $P < 0.001$; Fig. 2A). As

expected, the percentage of neutrophils was significantly higher in PosC-SBP and NegC-SBP than in SA (PosC-SBP $75.44 \pm 6.14\%$, NegC-SBP $61.25 \pm 5.20\%$, SA $8.42 \pm 2.09\%$; PosC-SBP vs. SA, $P < 0.001$; NegC-SBP vs. SA, $P < 0.001$; Fig. 2B). This finding can be explained by the IL-6 production of recently recruited neutrophils in PosC-SBP [19]. In recent studies, IL-6 was also shown to suppress neutrophil apoptosis via a platelet-activating factor-like mechanism [20, 21]. Other reports showed that IL-6 represents a regulator of neutrophil trafficking during the inflammatory response, because it orchestrates chemokine production [22]. After antibiotic treatment, the percentage of neutrophils decreased significantly in PosC-SBP ($27 \pm 88\%$, $P < 0.001$) and NegC-SBP ($15.67 \pm 5.63\%$, $P = 0.002$; Fig. 2B). Despite the higher percentage of neutrophils in PosC-SBP and NegC-SBP, these cells in both groups had an impaired oxidative burst (MFI 12.08 ± 3.75 and 11.10 ± 4.2 , respectively) compared with SA neutrophils (33.65 ± 7.35 ; $P = 0.04$ and $P = 0.03$, respectively; Fig. 2C and D). After treatment, the oxidative burst of neutrophils from NegC-SBP, but not from PosC-SBP, increased significantly (35.85 ± 7.27), reaching levels similar to SA.

Association of cytokine levels with macrophage phenotype and function

The influence of the elevated cytokine concentrations was not limited to neutrophils. The phenotype and function of

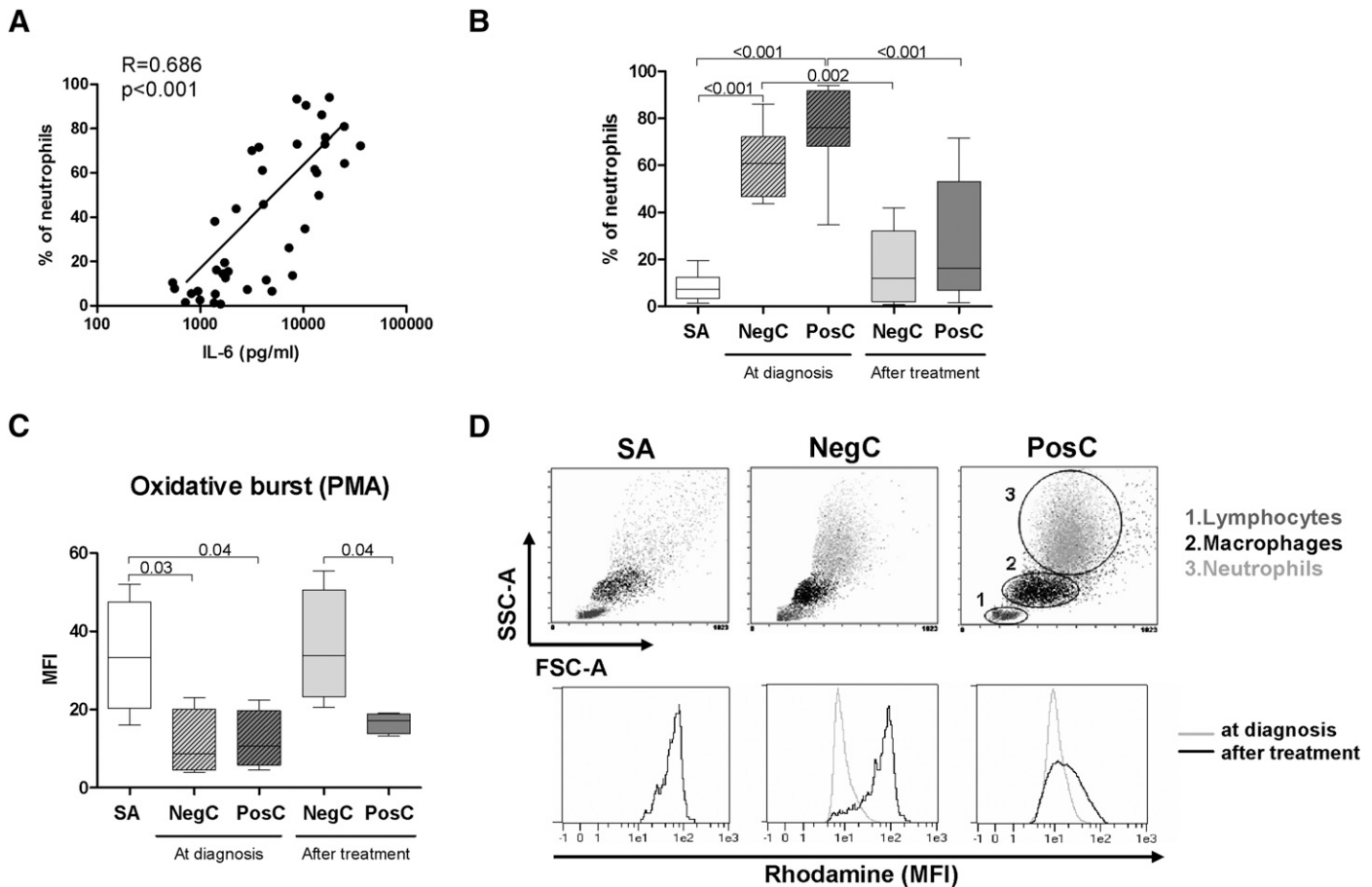


Figure 2. Neutrophil percentages and function in SA ($n = 9$), NegC-SBP ($n = 8$), and PosC-SBP ($n = 11$). (A) Correlation between IL-6 concentration and neutrophil percentages in SA and SBP (Spearman correlation). (B) Neutrophil percentages in ascitic fluid from patients with SA, NegC-SBP, and PosC-SBP at diagnosis and after antibiotic treatment. (C) Oxidative burst activity in neutrophils of the ascitic fluid from patients with SA, NegC-SBP, and PosC-SBP. The Mann-Whitney U test was used for the comparisons between the SA and 2 SBP groups and the Wilcoxon test for the comparison between the same group before and after treatment. (D) Flow cytometry dot plots with the cellular morphology (SSC-A and forward light scatter [FSC]-A) identifying the 3 major subpopulations of leukocytes and histograms with rhodamine. MFI expression (oxidative burst measure) of gated neutrophils from 3 representative patients with SA, NegC-SBP, and PosC-SBP at diagnosis.

macrophages of the ascitic fluid from patients with cirrhosis was also associated with the IL-6 and IL-10 levels. The IL-10 levels correlated with the presence of ascitic macrophages with low granularity (low SSC; $R = -0.414$, $P = 0.007$; Fig. 3A). The ascites from the NegC-SBP and PosC-SBP patients had significantly more macrophages with low SSC than did those from SA patients (percentage of PosC-SBP, $79.70 \pm 6.07\%$; percentage of NegC-SBP, $79.81 \pm 4.84\%$, and percentage of SA, $58.10 \pm 6.87\%$; PosC-SBP vs. SA, $P = 0.03$; NegC-SBP vs. SA, $P = 0.02$; Fig. 3B). It is possible that the production of IL-6 by resident macrophages precedes the production of IL-10 and the recruitment of peripheral blood neutrophils and monocytes with low granularity [23]. After treatment, the percentage of low SSC macrophages in PosC-SBP and NegC-SBP was similar to that of SA (PosC-SBP $68.68 \pm 5.85\%$, NegC-SBP $59.66 \pm 7.48\%$). Macrophages from NegC-SBP and PosC-SBP also had a lower expression of CD14 on the cell surface (measured as MFI) than did macrophages from SA (Fig. 3B). PosC-SBP macrophages in our study showed the lowest expression of CD14 and cellular complexity, comparable in expression to peripheral blood monocytes. According to the

previously reported events during infection in PosC-SBP, it is possible that induced chemokines and hemodynamic derangement facilitate the recruitment of circulating monocytes to ascites [13, 24, 25]. This CD14 expression on the macrophages of ascitic fluid correlated inversely with the IL-6 levels ($R = -0.436$, $P = 0.005$; Fig. 3C). We next found that differences in CD14 expression were accompanied by changes in macrophage function. The particular ascitic fluid environment then induced a specific phenotype—and consequent function—of macrophages. A strong correlation was observed between CD14 expression and phagocytosis ($R = 0.841$, $P < 0.001$). Macrophages from PosC-SBP and NegC-SBP ascites, predominantly with CD14^{low} expression, had an impaired phagocytosis (MFI 26.67 ± 10.75 and 31.81 ± 4.26 , respectively). A direct consequence of this phenotype is the poor bactericidal capacity of PosC-SBP macrophages [26, 27] and the tolerant state of the macrophages. After treatment, phagocytosis of macrophages from NegC-SBP increased, reaching levels similar to that of SA macrophages (NegC-SBP 84.73 ± 25.04 , PosC-SBP 36.41 ± 13.89 , SA 74.27 ± 2.79 ; Fig. 3D). However, the phagocytosis of macrophages from PosC-SBP

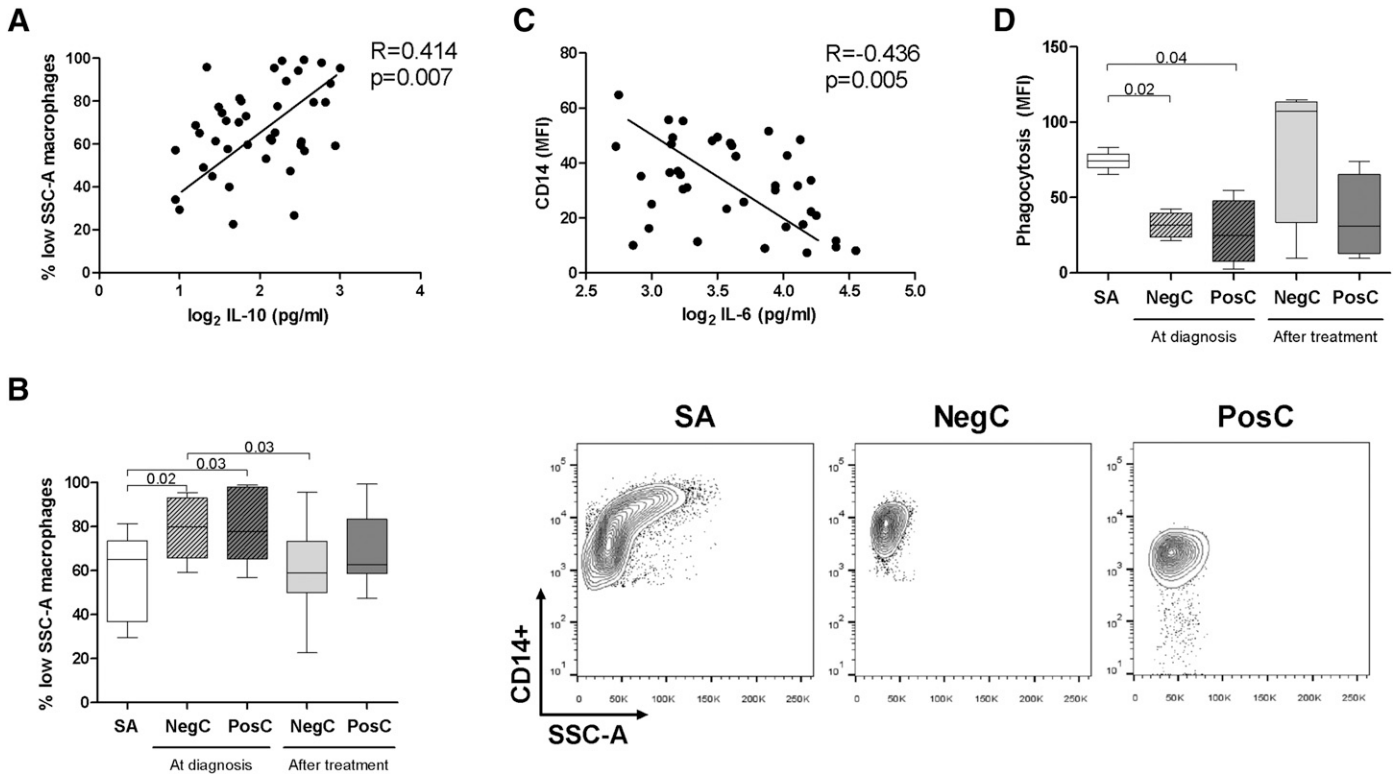


Figure 3. Macrophage phenotype, morphology, and function in SA ($n = 9$), NegC-SBP ($n = 8$), PosC-SBP ($n = 11$). (A) Correlation between IL-10 concentration and morphology (SSC) of macrophages (Spearman correlation). (B) Percentages of macrophages with low granularity (measured as SSC) in ascitic fluid of patients at diagnosis and after antibiotic treatment. The Mann-Whitney U test was used for the comparisons between SA and the 2 SBP groups and the Wilcoxon test for the comparisons between the same group before and after treatment. Representative flow cytometry contour plot of ascitic macrophages from patients with SA, NegC-SBP, and PosC-SBP. Plot shows SSC on the X-axis (morphology parameter corresponding to cellular granularity) and CD14 expression on the Y-axis. (C) Correlation between IL-6 and CD14 expression (MFI) on macrophages of ascitic fluid. (D) Phagocytic activity expressed as MFI in the macrophages of ascitic fluid from patients. The Mann-Whitney U test was used for the comparisons between the SA and 2 SBP groups and the Wilcoxon test for the comparisons between the same group before and after treatment.

did not increase. In this context, bacteria in the ascitic fluid cannot be easily destroyed, and PosC-SBP patients have a high pre-disposition to ascitic fluid infection recurrence [28].

Phenotypic profile of ascitic macrophages

To fully understand the capability of ascitic macrophages from PosC-SBP, NegC-SBP, and SA, we analyzed the surface markers involved in activation (CD64, CD16, and CD86), adhesion (CD11b), antigen presentation (HLA-DR), and scavenger receptors (CD36, CD163, and CD206) by flow cytometry (Fig. 4 and Supplemental Figs. 1 and 2). Macrophages were gated according to CD14⁺ expression (Supplemental Fig. 1). The levels of CD11b and CD86 were significantly lower in NegC-SBP and PosC-SBP than in SA macrophages (for MFI of CD11b, PosC-SBP 5.05 ± 0.75 and NegC-SBP 5.76 ± 1.19 vs. SA 9.76 ± 1.22 ; $P = 0.005$ and $P = 0.04$, respectively; for MFI of CD86, PosC-SBP 1.34 ± 0.16 and NegC-SBP 1.59 ± 0.31 vs. SA 3.06 ± 0.32 ; $P = 0.003$ and $P = 0.01$, respectively). The levels of HLA-DR, CD16, and CD206 were significantly lower in PosC-SBP than in SA (for MFI of HLA-DR, PosC-SBP 6.35 ± 0.84 vs. SA 16.46 ± 1.85 ; $P < 0.001$; for the percentage of CD16⁺ cells: PosC-SBP 52.57 ± 8.06 vs. SA 81.85 ± 6.20 ; $P = 0.01$; for the percentage of CD206⁺ cells, PosC-SBP 32.37 ± 8.59 vs. SA 66.58 ± 6.52 ; $P = 0.01$). The levels of

CD64, CD36, and CD163 were similar in the 3 groups of patients at diagnosis. The expression of surface markers on macrophages from SA was compatible with the phenotype of resident macrophages of the peritoneal cavity. High HLA-DR expression confirmed that these macrophages are fully competent APCs. The marker expression of PosC-SBP, with low levels of HLA-DR, CD11b, CD16, and CD86, suggests an impaired ability for antigen presentation, phagocytosis, and adhesion [29]. A similar low HLA-DR expression has recently been described on ascitic macrophages from patients with NegC-SBP, and it has been associated with a high bacterial DNA burden [9].

After treatment, the levels of CD86 increased significantly (PosC-SBP 2.50 ± 0.36 and NegC-SBP 2.74 ± 0.33 ; $P = 0.01$ and $P = 0.03$, respectively), reaching levels similar to those of SA. Treatment significantly increased the levels of HLA-DR, CD16, and CD206 on PosC-SBP macrophages (MFI $23.98 \pm 4.45\%$, $P = 0.01$; $70.34 \pm 4.79\%$, $P = 0.01$; $76.23 \pm 9.90\%$, $P = 0.05$, respectively). In PosC-SBP, the CD64 and CD36 had significantly increased after antibiotic treatment (CD64 before 2.44 ± 0.31 and after 3.82 ± 0.61 , $P = 0.03$; CD36 before 3.04 ± 0.39 and after 5.34 ± 0.49 , $P = 0.01$). We showed that by eliminating bacteria with antibiotics, the phenotype, but not the function, of ascitic macrophages in PosC-SBP can be switched to a steady state. Many

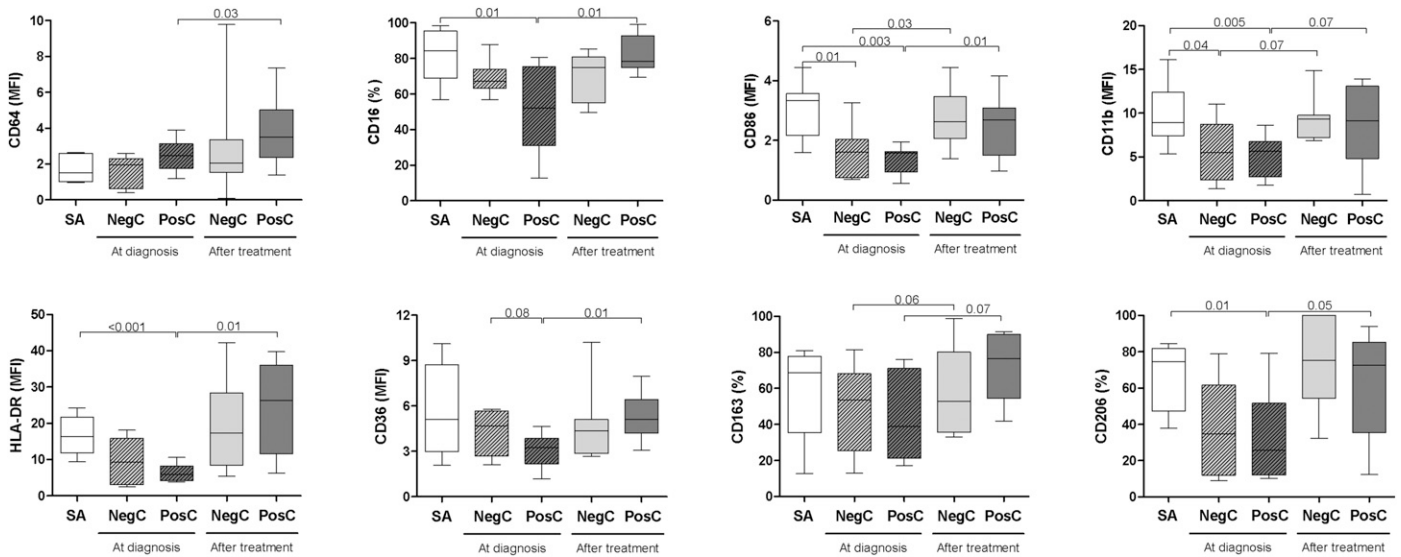


Figure 4. Phenotype of macrophages in SA ($n = 9$), NegC-SBP ($n = 8$), and PosC-SBP ($n = 11$) by flow cytometry. Ascitic macrophages were gated based on CD14⁺ expression. They were also stained with monoclonal antibodies anti-CD16, anti-CD64, anti-CD86, anti-HLA-DR, anti-CD11b, anti-CD206, anti-CD36, and anti-CD163. The results are expressed as the percentage of cells for CD16, CD163, and CD206 and as the MFI for CD64, CD86, CD11b, HLA-DR, and CD36. The Mann-Whitney U test was used for the comparisons between the SA and SBP groups and the Wilcoxon test for the comparisons between the same group before and after treatment.

changes can be induced by this antibiotic therapy. Antibiotics decrease the circulating endotoxin levels and the presence of viable bacteria, regulate the production of inflammatory mediators [30], and prevent episodes of recurrent SBP and other bacterial infections [31–33]. Many of these changes might influence the phenotype of ascitic macrophages. Our findings, along with those of others, suggest that antibiotics have different consequences depending on the presence or absence of viable bacteria in the SBP. This treatment can fully restore the functional status of neutrophils and macrophages from NegC-SBP but not from PosC-SBP. Several nonexclusive models could explain the different behavior between NegC-SBP and PosC-SBP. One possibility is that the stage of macrophages in NegC-SBP and PosC-SBP differs at SBP diagnosis. If left untreated, one third of NegC-SBP patients can have positive microbial test findings, suggesting that NegC-SBP macrophages at diagnosis are at an earlier infection phase [34]. A second possibility is that the presence of more viable bacteria in PosC-SBP than in NegC-SBP requires longer antibiotic treatment to completely clear the infection. A recent study observed that infectious stimuli induce a functional switch in the macrophages of the peritoneum [35]. Despite the lack of viable bacteria in NegC-SBP, ascites from these patients could contain bacterial fragments. One recent study detected bacterial DNA by RT-PCR in NegC-SBP [36, 37], and this DNA can effectively activate cells [10]. However, bacterial fragments and viable bacteria are not necessarily equivalent at the level of macrophage activation. A third possibility is that, even in the absence of viable bacteria or their products, the presence of particular inflammatory mediators in the ascitic fluid of NegC-SBP and PosC-SBP modulate macrophage phenotype distinctly [38]. We are currently studying other soluble factors that could contribute to the differences between NegC-SBP and PosC-SBP at the end of treatment.

Our results suggest that regular phenotyping and an extensive analysis of the immune state of macrophages and neutrophils from the ascitic fluid could help to further understand the pathophysiological events in ascitic fluid infection and to optimize the treatment of these patients.

AUTHORSHIP

J.C.N. performed ELISA, functional assays, and flow cytometry experiments, analyzed results, and wrote the manuscript. E.S. performed flow cytometry experiments and analyzed results. C.R., E.R., and M.P. included patients, collected samples, and determined the clinical characterization of the patients. C.G. and C.J. analyzed the results and supervised the experiments. G.S. analyzed the results, included patients, collected samples, and wrote the manuscript. S.V. performed the experimental design, analyzed the results, and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Grants PI09/00357 and PI09/00132 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain. S.V. was supported by “Fondo Investigaciones Sanitarias” and was a participant in the Program for Stabilization of Investigators of the “Direcció d’Estrategia i Coordinació del Departament Salut de la Generalitat de Catalunya.” This work has been performed within the Ph.D. Immunology Program of Universitat Autònoma de Barcelona. The authors thank Carolyn Newey for helpful editorial assistance.

DISCLOSURES

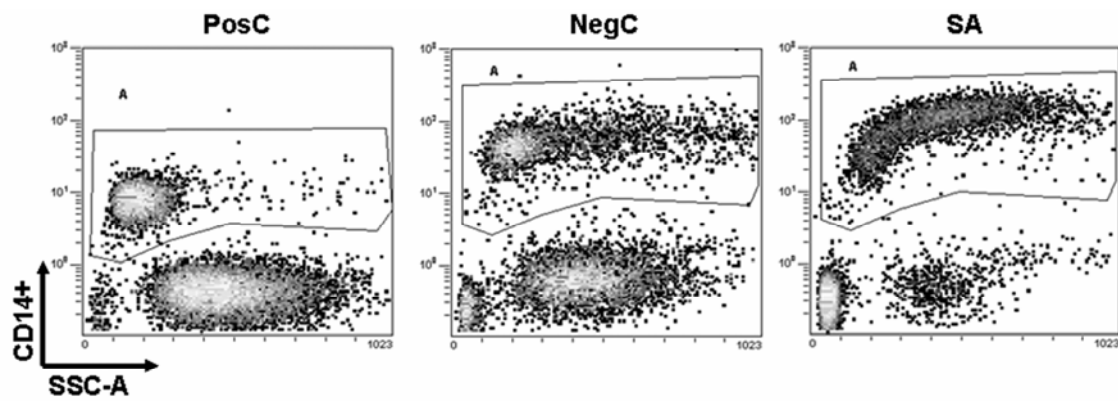
The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

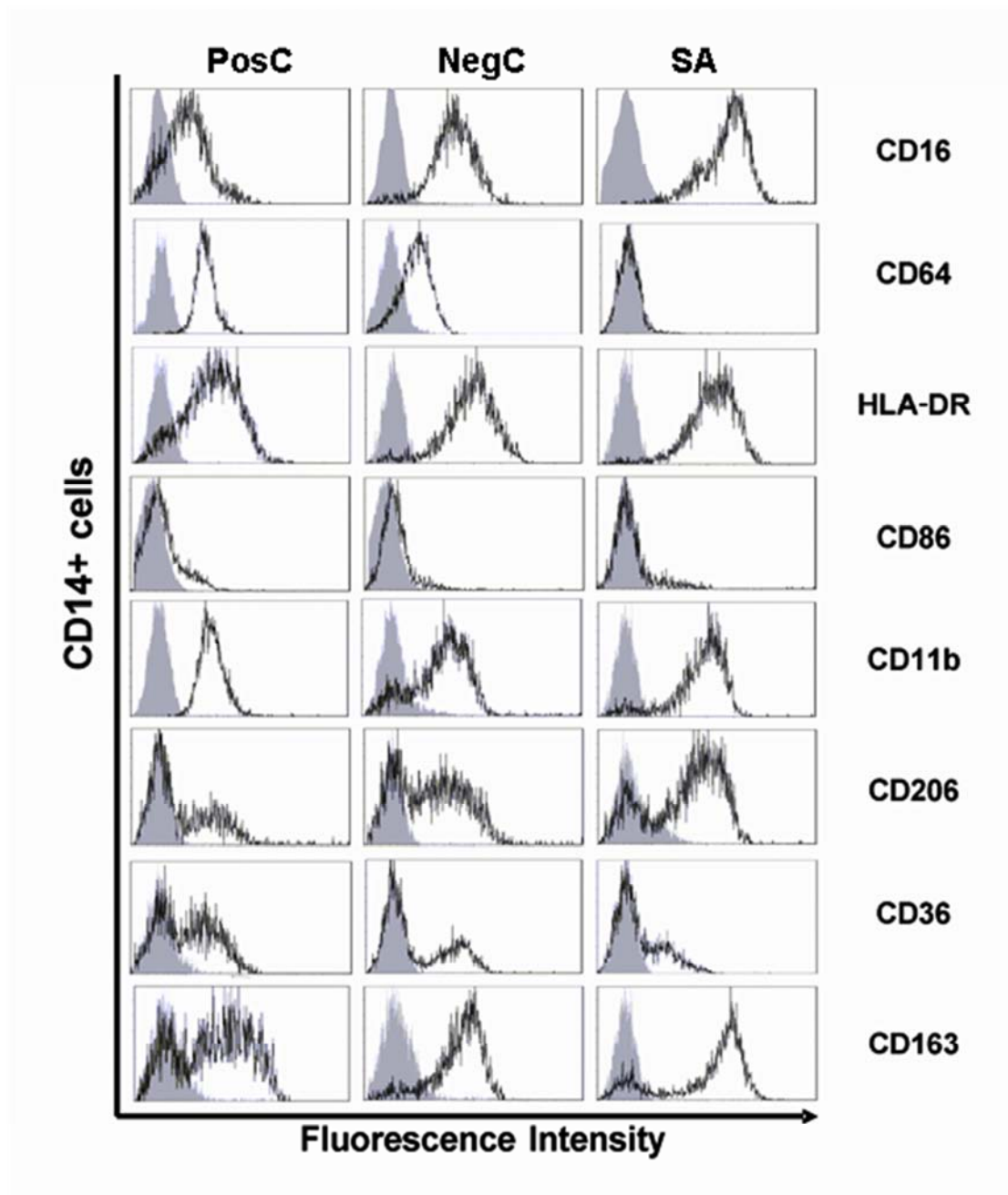
- Căruntu, F. A., Benea, L. (2006) Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, treatment. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **15**, 51–56.
- Guarner, C., Runyon, B. A., Young, S., Heck, M., Sheikh, M. Y. (1997) Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J. Hepatol.* **26**, 1372–1378.
- Bhat, G., Vandana, K. E., Bhatia, S., Suvarna, D., Pai, C. G. (2013) Spontaneous ascitic fluid infection in liver cirrhosis: bacteriological profile and response to antibiotic therapy. *Indian J. Gastroenterol.* **32**, 297–301.
- Soriano, G., Castellote, J., Alvarez, C., Gírbau, A., Gordillo, J., Baliellas, C., Casas, M., Pons, C., Román, E. M., Maisterra, S., Xiol, X., Guarner, C. (2010) Secondary bacterial peritonitis in cirrhosis: a retrospective study of clinical and analytical characteristics, diagnosis and management. *J. Hepatol.* **52**, 39–44.
- Mowat, C., Stanley, A. J. (2001) Review article: spontaneous bacterial peritonitis—diagnosis, treatment and prevention. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 1851–1859.
- Rimola, A., García-Tsao, G., Navasa, M., Piddock, L. J., Planas, R., Bernard, B., Inadomi, J. M. (2000) Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J. Hepatol.* **32**, 142–153.
- Mao, T. K., Lian, Z. X., Selmi, C., Ichiki, Y., Ashwood, P., Ansari, A. A., Coppel, R. L., Shimoda, S., Ishibashi, H., Gershwin, M. E. (2005) Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **42**, 802–808.
- Tapia-Abellán, A., Martínez-Esparza, M., Ruiz-Alcaraz, A. J., Hernández-Caselles, T., Martínez-Pascual, C., Miras-López, M., Such, J., Francés, R., García-Peñarubia, P. (2012) The peritoneal macrophage inflammatory profile in cirrhosis depends on the alcoholic or hepatitis C viral etiology and is related to ERK phosphorylation. *BMC Immunol.* **13**, 42.
- Fagan, K. J., Rogers, G. B., Melino, M., Arthur, D. M., Costello, M. E., Morrison, M., Powell, E. E., Irvine, K. M. (2015) Ascites bacterial burden and immune cell profile are associated with poor clinical outcomes in the absence of overt infection. *PLoS One* **10**, e0120642.
- Francés, R., Muñoz, C., Zapater, P., Uceda, F., Gascón, I., Pascual, S., Pérez-Mateo, M., Such, J. (2004) Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* **53**, 860–864.
- Paulsson, J. M., Held, C., Jacobson, S. H., Lundahl, J. (2009) In vivo extravasated human monocytes have an altered expression of CD16, HLA-DR, CD86, CD36 and CX(3)CR1. *Scand. J. Immunol.* **70**, 368–376.
- Zamora, C., Cantó, E., Nieto, J. C., Angels Ortiz, M., Juárez, C., Vidal, S. (2012) Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals. *Cytokine* **60**, 257–265.
- Girón-González, J. A., Rodríguez-Ramos, C., Elvira, J., Galán, F., Del Alamo, C. F., Díaz, F., Martín-Herrera, L. (2001) Serial analysis of serum and ascitic fluid levels of soluble adhesion molecules and chemokines in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin. Exp. Immunol.* **123**, 56–61.
- Propst, T., Propst, A., Herold, M., Schauer, G., Judmaier, G., Braunsteiner, H., Stöffler, G., Vogel, W. (1993) Spontaneous bacterial peritonitis is associated with high levels of interleukin-6 and its secondary mediators in ascitic fluid. *Eur. J. Clin. Invest.* **23**, 832–836.
- Zeni, F., Tardy, B., Vindimian, M., Comtet, C., Page, Y., Cusey, I., Bertrand, J. C. (1993) High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the ascitic fluid of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 218–223.
- Kovacs, E. (2010) Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells? *Leuk. Res.* **34**, 912–916.
- Rodríguez-Ramos, C., Galan, F., Díaz, F., Elvira, J., Martín-Herrera, L., Girón-González, J. A. (2001) Expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of spontaneous bacterial peritonitis. *Dig. Dis. Sci.* **46**, 1668–1676.
- Avrănescu, C. S., Comănescu, V., Popescu, S. N., Turculeanu, A., Bălăsoiu, M., Popescu, C. F., Lungulescu, M. (2008) Correlations among the serum levels of some interleukins and the histopathological aspects in chronic viral hepatitis C. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **49**, 57–62.
- Melani, C., Mattia, G. F., Silvani, A., Carè, A., Rivoltini, L., Parmiani, G., Colombo, M. P. (1993) Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. *Blood* **81**, 2744–2749.
- Asensi, V., Valle, E., Meana, A., Fierer, J., Celada, A., Alvarez, V., Paz, J., Coto, E., Carton, J. A., Maradona, J. A., Dieguez, A., Sarasúa, J., Ocaña, M. G., Arribas, J. M. (2004) In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect. Immun.* **72**, 3823–3828.
- Biffl, W. L., Moore, E. E., Moore, F. A., Barnett, C. C., Jr., Silliman, C. C., Peterson, V. M. (1996) Interleukin-6 stimulates neutrophil production of platelet-activating factor. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 569–574.
- Fielding, C. A., McLoughlin, R. M., McLeod, L., Colmont, C. S., Najdovska, M., Grail, D., Ernst, M., Jones, S. A., Topley, N., Jenkins, B. J. (2008) IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J. Immunol.* **181**, 2189–2195.
- Martin, W. J., Walton, M., Harper, J. (2009) Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. *Arthritis Rheum.* **60**, 281–289.
- Kim, J. K., Chon, C. Y., Kim, J. H., Kim, Y. J., Cho, J. H., Bang, S. M., Ahn, S. H., Han, K. H., Moon, Y. M. (2007) Changes in serum and ascitic monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and IL-10 levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *J. Interferon Cytokine Res.* **27**, 227–230.
- Martínez-Brú, C., Gómez, C., Cortés, M., Soriano, G., Guarner, C., Planella, T., González-Sastre, F. (1999) Ascitic fluid interleukin-8 to distinguish spontaneous bacterial peritonitis and sterile ascites in cirrhotic patients. *Clin. Chem.* **45**, 2027–2028.
- Runyon, B. A., Van Epps, D. E. (1986) Diuresis of cirrhotic ascites increases its opsonic activity and may help prevent spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* **6**, 396–399.
- Such, J., Guarner, C., Enriquez, J., Rodriguez, J. L., Seres, I., Vilardell, F. (1988) Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J. Hepatol.* **6**, 80–84.
- Titó, L., Rimola, A., Ginès, P., Llach, J., Arroyo, V., Rodés, J. (1988) Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology* **8**, 27–31.
- Del Fresno, C., García-Río, F., Gómez-Piña, V., Soares-Schanoski, A., Fernández-Ruiz, I., Jurado, T., Kajiji, T., Shu, C., Marín, E., Gutiérrez del Arroyo, A., Prados, C., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., Biswas, S. K., López-Collazo, E. (2009) Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J. Immunol.* **182**, 6494–6507.
- Navasa, M., Follo, A., Filella, X., Jiménez, W., Francitorra, A., Planas, R., Rimola, A., Arroyo, V., Rodés, J. (1998) Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* **27**, 1227–1232.
- Fernández, J., Navasa, M., Planas, R., Montoliu, S., Monfort, D., Soriano, G., Vila, C., Pardo, A., Quintero, E., Vargas, V., Such, J., Ginès, P., Arroyo, V. (2007) Primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis delays hepatorenal syndrome and improves survival in cirrhosis. *Gastroenterology* **133**, 818–824.
- Rolachon, A., Cordier, L., Bacq, Y., Noursbaum, J. B., Franza, A., Paris, J. C., Fratte, S., Bohn, B., Kitmacher, P., Stahl, J. P., et al. (1995) Ciprofloxacin and long-term prevention of spontaneous bacterial peritonitis: results of a prospective controlled trial. *Hepatology* **22**, 1171–1174.
- Singh, N., Gayowski, T., Yu, V. L., Wagener, M. M. (1995) Trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **122**, 595–598.
- Runyon, B. A., Hoefs, J. C. (1984) Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* **4**, 1209–1211.
- Cassado, Ados, A., de Albuquerque, J. A., Sardinha, L. R., Buzzo, Cde, L., Faustino, L., Nascimento, R., Ghosn, E. E., Lima, M. R., Alvarez, J. M., Bortoluci, K. R. (2011) Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS One* **6**, e22141.
- Soriano, G., Esparcia, O., Montemayor, M., Guarner-Argente, C., Pericas, R., Torras, X., Calvo, N., Román, E., Navarro, F., Guarner, C., Coll, P. (2011) Bacterial DNA in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33**, 275–284.
- Such, J., Francés, R., Muñoz, C., Zapater, P., Casellas, J. A., Cifuentes, A., Rodríguez-Valera, F., Pascual, S., Sola-Vera, J., Carnicer, F., Uceda, F., Palazón, J. M., Pérez-Mateo, M. (2002) Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* **36**, 135–141.
- Roca, H., Varsos, Z. S., Sud, S., Craig, M. J., Ying, C., Pienta, K. J. (2009) CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J. Biol. Chem.* **284**, 34342–34354.

KEY WORDS:

cirrhosis · immunophenotyping · phagocytosis · oxidative burst · macrophages



Supplem. Figure 1 . Gating strategy for the phenotype analysis of macrophages in SA, NegC-SBP and PosC-SBP by flow cytometry. Three representative images of the dot plot representation of ascitic leukocytes according to CD14 expression and SSC (granularity). For the analysis of each marker, cells in gate A were selected.



Supplem. Figure 2. Phenotype of macrophages in SA, NegC-SBP and PosC-SBP. Ascitic leukocytes were stained with anti-CD16, CD64, HLA-DR, CD86, CD11b, CD206, CD36 and CD163 and gated according to CD14+ expression (gate A in Supplem. Figure 1) for the flow cytometry analysis. Representative histograms of macrophages from SA, NegC-SBP and PosC-SBP were shown.

CIRRHOSIS AND LIVER FAILURE

VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis

Elisabet Sánchez^{1,6,8,9,*}, Juan C. Nieto^{2,6,9,*}, Ana Boullosa⁷, Silvia Vidal^{2,6,9}, Francesc J. Sancho⁴, Giacomo Rossi¹⁰, Pau Sancho-Bru^{7,8}, Rosa Oms⁵, Beatriz Mirelis^{3,9}, Cándido Juárez^{2,9}, Carlos Guarner^{1,6,8,9} and Germán Soriano^{1,6,8,9}

1 Department of Gastroenterology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

2 Department of Immunology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

3 Department of Microbiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

4 Department of Pathology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

5 Department of Biochemistry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

6 Institut d'Investigacions Biomèdiques (IB) Sant Pau, Barcelona, Spain

7 Institut Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

8 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

9 Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain

10 School of Veterinary Medical Sciences, University of Camerino, Camerino, Italy

Keywords

experimental model – inflammatory response
– intestinal barrier – liver damage –
microbiota

Correspondence

German Soriano, MD, PhD, Department of
Gastroenterology, Hospital de la Santa Creu i
Sant Pau, Mas Casanovas 90, 08041
Barcelona, Spain
Tel: 34-93-5565920
Fax: 34-93-5565608
e-mail: gsoriano@santpau.cat

Received 12 February 2014

Accepted 17 April 2014

DOI:10.1111/liv.12566

Abstract

Background & Aims: Probiotics can prevent pathological bacterial translocation in cirrhosis by modulating intestinal microbiota and improving gut barrier and immune disturbances. To evaluate the effect of probiotic VSL#3 on bacterial translocation, intestinal microbiota, gut barrier and inflammatory response in rats with experimental cirrhosis. **Methods:** Forty-six Sprague-Dawley rats with CCl₄-induced cirrhosis were randomized into two groups: VSL#3 group ($n = 22$) that received VSL#3 in drinking water, and water group ($n = 24$) that received water only. Treatment began at week 6 of cirrhosis induction and continued until laparotomy, performed 1 week after development of ascites or at week 20. A control group included 11 healthy rats. At this study end, we evaluated bacterial translocation, intestinal flora, intestinal barrier (ileal claudin-2 and 4, β -defensin-1, occludin and malondialdehyde as index of oxidative damage) and serum cytokines. **Results:** Mortality during this study was similar in the VSL#3 group (10/22, 45%) and the water group (10/24, 42%) ($P = 1$). The incidence of bacterial translocation was 1/12 (8%) in the VSL#3 group, 7/14 (50%) in the water group ($P = 0.03$ vs. VSL#3 group) and 0/11 in the control group ($P = 0.008$ vs. water group). The concentration of ileal and caecal enterobacteria and enterococci was similar in the two groups of cirrhotic rats. The ileal occludin concentration was higher and ileal malondialdehyde and serum levels of TNF- α were lower in the VSL#3 group than in the water group ($P < 0.05$). **Conclusions:** VSL#3 decreases bacterial translocation, the pro-inflammatory state and ileal oxidative damage and increases ileal occludin expression in rats with experimental cirrhosis.

Bacterial translocation is defined as the passage of gut bacteria and/or bacterial products through the intestinal barrier to mesenteric lymph nodes (1). Pathological bacterial translocation is considered to play a key role in cirrhosis, not only in the development of bacterial infections but also in the pro-inflammatory state, which in turn is related to other complications of the disease, such as ascites, renal failure, hepatic encephalopathy or

variceal bleeding (2–4). The mechanisms proposed to explain the increased bacterial translocation in cirrhosis include intestinal bacterial overgrowth, impairment in the intestinal barrier and alterations in immune defences (1–3).

Several strategies have been tested to prevent bacterial translocation in rats with experimental carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhosis and a high efficacy has been observed with antibiotics (2, 3, 5, 6). However, antibiotics favour the development of bacterial resistance, especially when administered for long

*Both authors contributed equally to the study.

periods of time (7). Therefore, alternative measures have been suggested, including beta-blockers (8), bile acids (9), prokinetics (10), antioxidants (11) and probiotics (6, 11). Probiotics are living organisms that produce a beneficial effect to the host when administered in a sufficient amount (12). Probiotics can prevent bacterial translocation by decreasing intestinal bacterial overgrowth and improving intestinal barrier and immune disturbances (13–15). Previous studies have evaluated *Lactobacillus* GG (6) and *Lactobacillus johnsonii* La1 (16) in rats with CCl₄-induced cirrhosis and *Lactobacillus acidophilus* in rats with portal vein ligation (17), but they have failed to show a benefit in bacterial translocation.

However, not all probiotics have the same effect in a given clinical or experimental situation (12–15). In addition, there is increasing evidence that the combination of several probiotics can have a more marked effect than a single strain (12–14, 18, 19). VSL#3 is a probiotic preparation that contains a mixture of eight different species of live bacteria (mainly lactobacilli and bifidobacteria). It has been shown to improve the intestinal barrier in several experimental models (20–22) and to be useful in the management of patients with inflammatory bowel disease (12, 13). VSL#3 decreased fibrosis in an experimental model of non-alcoholic steatohepatitis in mice (23) and improved liver function tests, pro-inflammatory cytokines and oxidative damage in patients with several liver diseases in a non-controlled study (19). Moreover, two randomized trials have shown that VSL#3 prevents hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis (24, 25). However, the effect of VSL#3 on bacterial translocation has not yet been tested in experimental cirrhosis.

The aim of this study was to evaluate the effect of VSL#3 on bacterial translocation, intestinal flora, intestinal barrier and inflammatory response in rats with CCl₄-induced cirrhosis.

Material and methods

Animals

Male Sprague-Dawley rats were included in this study. Rats were individually caged at a constant room temperature of 21°C and exposed to a 12:12 light/dark cycle. They were allowed free access to water and rat chow. This study was approved by the Animal Research Committee at the Institut de Recerca of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) and by the Departament de Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (DARP). Animals received care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Induction of cirrhosis

Cirrhosis was induced as previously described by Runyon *et al.* (26). Rats weighing 100–120 g were fed

standard rodent chow (A04, SAFE, Augy, France) and treated with 1.5 mM/L phenobarbital (Luminal, Kern Pharma S.L., Barcelona, Spain) in drinking water throughout this study. When rats reached a weight of 200 g, weekly doses of CCl₄ (Sigma-Aldrich Química S.L., Tres Cantos, Madrid, Spain) were given intragastrically using a sterile pyrogen-free syringe (KD Medical GMBH Hospital, Berlin, Germany) with an attached stainless steel animal feeding tube (Popper and Sons, New Hyde Park, NY, USA), without anaesthesia. The first dose of CCl₄ was 20 µl and subsequent doses were adjusted based on weight changes 48 h after the last dose, as previously reported (27).

Experimental design

At 6 weeks of induction of cirrhosis, animals were randomized to be treated with VSL#3 in drinking water (VSL#3 group) or drinking water alone (water group) until laparotomy was performed. A control group of non-cirrhotic rats receiving drinking water was also included. Mortality and ascites development during this study were recorded. Laparotomy was performed in cirrhotic rats 1 week after development of ascites confirmed by paracentesis or at 20 weeks of induction of cirrhosis if rats had not developed ascites. The moment to perform the laparotomy in control rats was decided by matching with cirrhotic rats.

VSL#3 administration

VSL#3 is a probiotic mixture of eight strains, namely *Streptococcus thermophilus* DSM 24731, bifidobacteria (*B. breve* DSM 24732, *B. longum* DSM 24736 and *B. infantis* DSM 24737) and lactobacilli (*L. paracasei* DSM 24733, *L. acidophilus* DSM 24735, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* DSM 24734 and *L. plantarum* DSM 24730). VSL#3 was provided by VSL Pharmaceuticals Inc., Towson, MD, USA, as lyophilized powder in sachets, each containing 3 g and 900×10^9 bacteria. Sachets were diluted in drinking water (23). The estimated daily dosage was calculated on the basis of doses previously used in humans (28) and according to the daily rat weight: 0.0128×10^9 bacteria per g of rat body weight. The doses were prepared in 100 ml containers every 24 h, considering that rats drink a mean amount of water of 30 ml/day. The daily calculated dose was therefore contained in 30 ml of water. Containers were shaken every 12 h to minimize settling of the probiotic. The daily VSL#3 dosage received by the rats was calculated on the basis of the daily volume of water with VSL#3 drunk by the rats.

Laparotomy

On the last day of this study, a laparotomy was performed under anaesthesia with 10 mg/kg of xylazine (Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany) and 50 mg/kg

ketamine (Ketolar, Parke-Dawis, New York, NY, USA) under sterile conditions. Samples of ascitic fluid, mesenteric lymph nodes, blood, liver, spleen, ileal stools and terminal ileal wall, caecal stools and pleural fluid were collected in this sequence. Rats were then euthanized with intravenous sodium thiopentate (Penthotal, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). Blood samples were collected into BD Vacutainer tubes (BDbiosciences, San Jose, CA, USA) containing ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) and centrifuged. The supernatants were recollected and frozen at -80°C for posterior analysis. The other samples were stored at -80°C . Liver samples were fixed in buffered formalin and embedded in paraffin. The ratio spleen/body weight was calculated as a surrogate marker of portal hypertension (29, 30).

Bacterial cultures and bacterial identification

Samples of homogenized mesenteric lymph nodes, liver and spleen, and ascitic and pleural fluid were inoculated on Columbia blood agar, Columbia CNA agar and the chromogenic media CPS ID2 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and incubated for 48 h at 37°C in an aerobic atmosphere. Isolates were presumptively identified according to their growth and morphology. Bacterial translocation was considered as any positive culture of mesenteric lymph nodes, liver, spleen, or ascitic or pleural fluids (11).

During laparotomy, samples of caecal and ileal faeces weighing 0.2 g were collected, homogenized and diluted with 2 ml of normal saline in sterile conditions. Serial decimal dilutions were performed to quantify the intestinal bacterial concentration. Samples of 100 μl of each dilution were inoculated on Columbia blood agar, Columbia CNA agar and the chromogenic media CPS ID2 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). After incubation for 48 h at 37°C in an aerobic atmosphere, the colonies were counted. Counts are expressed as \log_{10} cfu (colony forming units)/g of fresh faecal sample with a detection limit at 10^3 cfu/g (11).

Serum cytokine and renin levels

Serum supernatants were tested for tumour necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) concentrations using specific ELISAs (Peprotech, London, UK), according to the manufacturer's instructions. The detection limit was 30 pg/ml for TNF- α and IL-10. Serum renin levels were assessed using the specific ELISA kit for rat renin (Uscn Life Science Inc., Houston, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. The detection limit was 5.8 pg/ml.

Intestinal barrier

To perform Western blot analysis, protein was extracted from rat ileum using RIPA buffer, according to the manufacturer's protocol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO,

USA). For detection, 20 μg of proteins were separated on a 4–12% SDS-PAGE (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) gel and transferred to nitrocellulose. Membranes were incubated overnight with antibodies to claudin-2, claudin-4 (Invitrogen), occludin and β -defensin-1 (Antibodies-online Inc., Atlanta, GA, USA). Proteins were visualized using appropriate secondary antibodies conjugated to IR-dyes 800CW goat antirabbit IgG and 680LT goat antimouse IgG (H+L) (Li-cor, Lincoln, NE, USA) and scanned using the Odyssey Imaging System (Li-cor). Claudin-2, claudin-4, occludin and β -defensin-1 protein expression was quantified and normalized to β -actin detected using b-actin antibody (Sigma Aldrich).

Malondialdehyde (MDA) formation by the thiobarbiturate reaction was determined in ileal samples according to the method previously described to assess oxidative damage (30, 31). The detection limit of this assay was 0.079 nmol/mg protein.

Liver damage

Four- μm slices were obtained from paraffin blocks and evaluated by haematoxylin-eosin stains to assess histological changes and by Masson's trichrome stain to study the severity of fibrosis. A semiquantitative score was used by a single expert pathologist to blindly classify the liver samples into: 0- normal, 1- fibrosis with thin and incomplete fibrous tracts, 2- cirrhosis with regeneration nodules and thin complete fibrous tracts, and 3- cirrhosis with regeneration nodules and thick and complete fibrous tracts.

The degree of hepatic fibrosis was estimated by measuring the percentage of the area stained with picro-Sirius Red (Sirius Red F3B, Gurr-BDH Lab Supplies, Poole, England). The positive stained area was quantified using a morphometric analysis system. Briefly, 12 images were obtained with an optic microscope (Nikon Eclipse E600, Nikon Corporation, Japan) at magnification of $\times 20$. Images were imported with an image analysis system (AnalySIS, Soft-Imaging System, Munster, Germany) software and automatically merged. The positive area was the sum of the area of all positive pixels.

Immunohistochemical tests

Paraffin sections were also used to evaluate CD68 expression and desmin expression, indexes of Kupffer cells and stellate cells quantification respectively. Antigen retrieval was achieved by incubating slides in citrate buffer of pH 6.0 (for desmin) or EDTA of pH 8.0 (for CD68) in a steamer (Black & Decker, Towson, MD, USA) for 20 min. Non-specific immunoglobulin binding was blocked before application of the primary antibodies: monoclonal mouse antirat CD68 (Serotec, San Diego, CA, USA clone ED1, MCA341GA diluted 1:50) and polyclonal antirat desmin (Ab-CAM, San Diego,

CA, USA clone: ab15200, diluted 1:200) (32). A streptavidin–immunoperoxidase staining procedure (Dako, Carpinteria, CA, USA) visualized with 3,3'-diaminobenzidine substrate (Vector, Burlingame, UK) and counterstained with Mayer's haematoxylin was used for immunolabelling. Positive and negative immunohistochemical controls were used and are described in Supplementary material. Using a light microscope (Carl Zeiss), we quantified liver CD68 positive cells for scoring Kupffer cells and desmin positive cells for stellate cell activation. Results are expressed as positive cells per 62500 μm^2 (Supplementary material).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS statistical package (SPSS Inc. version 17.0, Chicago, IL, USA). All parameters are reported as percentages and mean \pm SEM. Differences between groups were analysed using the Fisher's exact test and the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. The probability of developing ascites was calculated by Kaplan–Meier test and compared with log rank test. Correlations were assessed by Pearson's test. A two-tailed *P* value below 0.05 was considered statistically significant.

Sample size was calculated according to previous data from our group (11). Considering an α error of 0.05, a β error of 0.20, an expected percentage of bacterial translocation of 62% in the group of cirrhotic rats treated with water and of 8% in rats treated with VSL#3, and a 50% overall mortality during this study, we calculated a total of 22 animals in each group of rats with induced cirrhosis were required.

Results

Forty-six rats under induction of cirrhosis were included in this study. At 6 weeks of CCl_4 treatment, they were randomized into the VSL#3 group ($n = 22$) or the water group ($n = 24$). An additional control group of 11 healthy rats was included.

The time elapsed between randomization at week 6 and the end of this study (death, laparotomy 1 week after development of ascites, or laparotomy at week 20) was similar in the VSL#3 group and the water group (8.6 ± 1.0 vs. 8.1 ± 0.7 weeks, $P = 0.77$). However, when considering only the rats that reached laparotomy, the time was 11.9 ± 0.9 vs. 9.1 ± 0.8 weeks respectively ($P = 0.04$). Therefore, the total dose of CCl_4 received per rat that reached laparotomy was slightly higher in the VSL#3 group than in the water group: 7103.3 ± 948.6 vs. 4744.2 ± 678.3 μl ($P = 0.06$). These differences were because of the delay in ascites formation and the consequent delay in completing this study in VSL#3-treated rats, as commented below. The mean daily volume of water with VSL#3 that the rats in the VSL#3 group drank during this study was 33.2 ± 1.4 ml/day. Accordingly, the estimated VSL#3

daily dose received by the rats in the VSL#3 group was $4.9 \pm 0.3 \times 10^9$ bacteria.

VSL#3 administration did not reduce mortality but decreased ascites formation

Mortality during this study was 10/22 (45%) in the VSL#3 group, 10/24 (42%) in the water group ($P = 1$ with respect to VSL#3 group) and 0/11 (0%) in the control group ($P = 0.01$ with respect to the other two groups). The number of cirrhotic rats that developed ascites demonstrated by paracentesis before week 20 was 8/22 (36.4%) in the VSL#3 group and 18/24 (75%) in the water group ($P = 0.01$). The probability of developing ascites at week 20 was 51% in the VSL#3 group and 100% in the water group ($P = 0.01$). Therefore, VSL#3 treatment did not modify mortality in cirrhotic rats but decreased ascites formation in comparison with the water group.

VSL#3 administration reduced bacterial translocation

As shown in Fig. 1, the incidence of bacterial translocation was significantly lower in the VSL#3 group (1/12, 8%) than in the water group (7/14, 50%) ($P = 0.03$). The incidence of bacterial translocation was higher in the water group than in control rats (0/11, 0%) ($P = 0.008$). Table 1 shows the bacteria and the sites where bacteria were isolated. *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp were the bacteria detected in cirrhotic rats, mainly in the mesenteric lymph nodes.

VSL#3 administration did not change faecal microbiota

Figure 2 shows the concentration of ileal and caecal enterobacteria and enterococci in the three study groups. The two groups of cirrhotic rats showed higher bacterial counts than control rats. This difference was statistically significant for caecal enterobacteria. However, we did not observe differences between the two

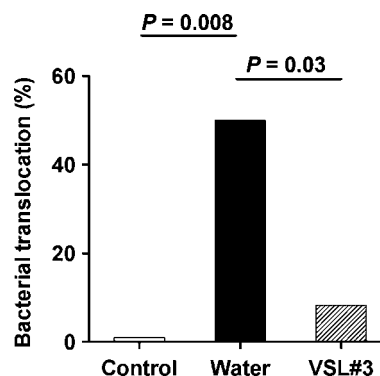
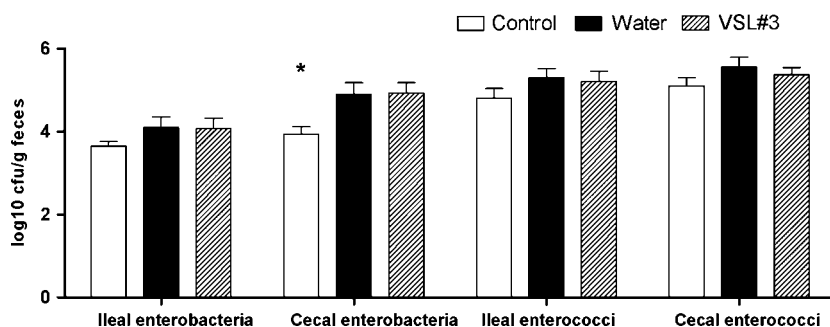


Fig. 1. Incidence of bacterial translocation in control rats (control group), cirrhotic rats treated with water (water group) and cirrhotic rats treated with VSL#3 (VSL#3 group).

Table 1. Bacteria isolated in mesenteric lymph nodes, ascitic fluid, pleural fluid, liver and spleen in the two groups of cirrhotic rats

Group	Rat	Isolated bacteria	Mesenteric lymph nodes	Ascitic fluid	Pleural fluid	Liver	Spleen
Water group	1	<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> spp.	+	–	–	–	–
	2	<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> spp.	+	–	+	+	+
	3	<i>Enterococcus</i> spp.	–	–	–	–	+
	4	<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> spp.	+	–	+	–	–
	5	<i>E. coli</i>	+	–	+	+	+
	6	<i>E. coli</i>	+	+	–	–	–
	7	<i>E. coli</i>	+	–	–	–	–
VSL#3 group	1	<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> spp.	+	+	–	–	–

**Fig. 2.** Bacterial concentration in ileal and caecal faeces in control rats (control group), cirrhotic rats treated with water (water group) and cirrhotic rats treated with VSL#3 (VSL#3 group). * $P = 0.007$ vs water group and vs VSL#3 group, p NS in the remaining parameters. cfu: colony forming units.

groups of cirrhotic rats (VSL#3 group and water group) in any of the microbiological determinations.

VSL#3 administration did not improve liver damage

Figure 3A and B, and Figure S1 (in Supplementary material) show the degree of liver damage assessed by the histological score and Sirius red staining. The two groups of rats with cirrhosis had higher histological scores and a higher percentage of Sirius red staining than control rats. These findings indicate the presence of severe fibrosis in all cirrhotic rats. However, there were no differences in these parameters between the VSL#3 group and the water group.

Figure 3C and D, and Figure S2 (in Supplementary material) show the expression of CD68 and desmin, as indexes of Kupffer cells and stellate cells quantification respectively. The two parameters were higher in the two groups of cirrhotic rats than in control rats, but there were no differences between the two groups of cirrhotic rats (VSL#3 and water groups).

VSL#3 administration reduced serum TNF- α

As observed in Fig. 4, rats from the VSL#3 group presented lower levels of serum TNF- α than rats from the water group. There were no differences between the VSL#3 group and the water group in IL-10 levels. TNF- α and IL-10 levels were higher in the

water group than in the control group, and IL-10 was higher in the VSL#3 group than in the control group.

Body weight, spleen/rat weight ratio and serum renin

Body weight was higher in the control group (475.9 ± 15.9 g) than in the groups of rats with cirrhosis ($P = 0.002$), but it did not differ between the VSL#3 group (398.4 ± 13.9 g) and the water group (393.4 ± 14.0 g) ($P = 0.66$). The spleen/body weight ratio was lower in control rats (0.0024 ± 0.0001) than in the two groups of rats with cirrhosis ($P < 0.001$), and it was lower in VSL#3 group (0.0048 ± 0.0002) than in the water group (0.0058 ± 0.0003) ($P = 0.01$). Serum renin levels were 258.6 ± 27.1 pg/ml in the VSL#3 group and 344.9 ± 52.3 pg/ml in the water group ($P = 0.36$).

Effect of VSL#3 administration on intestinal barrier

As shown in Fig. 5, the ileal occludin concentration was higher in the VSL#3 group than in the water group ($P = 0.01$) and lower in the water group than in control rats ($P = 0.001$). Moreover, ileal MDA levels were lower in the VSL#3 group than in the water group ($P = 0.02$) and higher in the water group than in the control group ($P = 0.03$). There was a positive correlation between ileal MDA and portal pressure assessed by spleen/rat

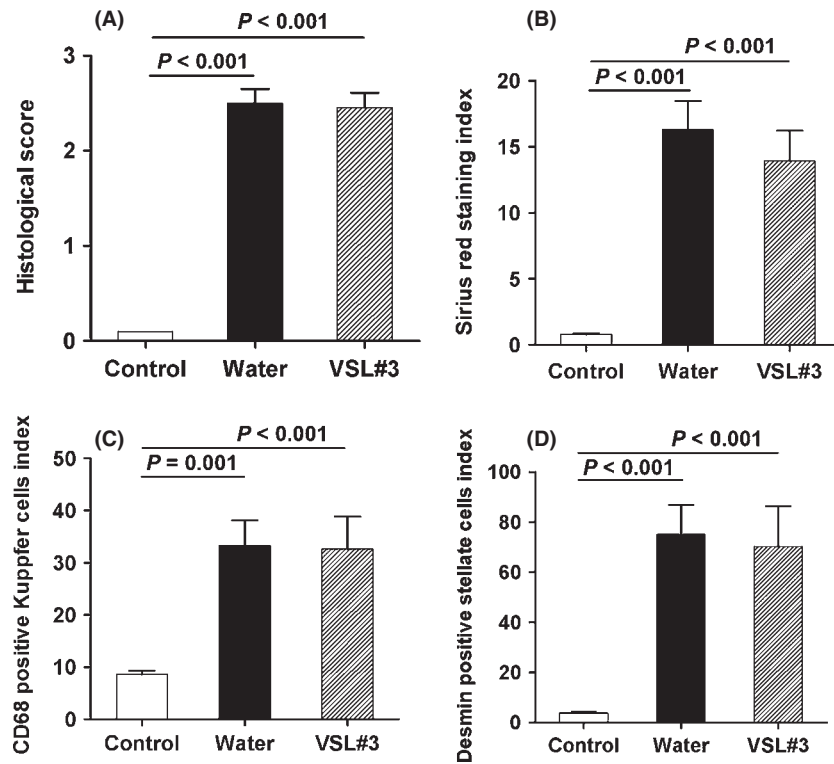


Fig. 3. Liver damage in control rats (control group), cirrhotic rats treated with water (water group) and cirrhotic rats treated with VSL#3 (VSL#3 group). (A) Histological score, (B) Sirius red staining, (C) CD68 positive Kupffer cells index, (D) Desmin positive stellate cells index.

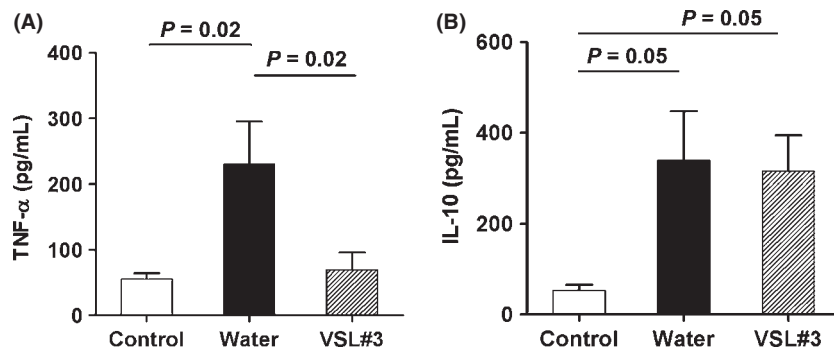


Fig. 4. Inflammatory response in control rats (control group), cirrhotic rats treated with water (water group) and cirrhotic rats treated with VSL#3 (VSL#3 group). (A) TNF- α , (B) IL-10. TNF- α : tumour necrosis factor-alpha, IL-10: interleukin-10.

weight ratio in all cirrhotic rats ($r = 0.52$, $P = 0.02$). Ileal MDA levels were higher in rats with bacterial translocation than in those without (2.0 ± 0.3 vs. 1.1 ± 0.1 nmol/mg protein, $P = 0.01$). There were no statistical differences between VSL#3 and water groups concerning ileal claudin-4, β -defensin-1 (Fig. 5) or claudin-2 (data not shown).

Discussion

The main finding in the present study was that VSL#3 probiotic treatment decreased bacterial translocation,

ascites formation and pro-inflammatory state in rats with CCl₄-induced cirrhosis.

Our results are in contrast with most previous experimental studies evaluating single probiotic strains in cirrhosis (6, 16) or prehepatic portal hypertension (17) that failed to show an effect of these treatments on bacterial translocation. Only one recently published study in an experimental model of Balb/c mice with CCl₄-induced cirrhosis submitted to an oral overload of *Escherichia coli* observed a decrease in bacterial DNA translocation in animals treated with *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 (33). These contradictory

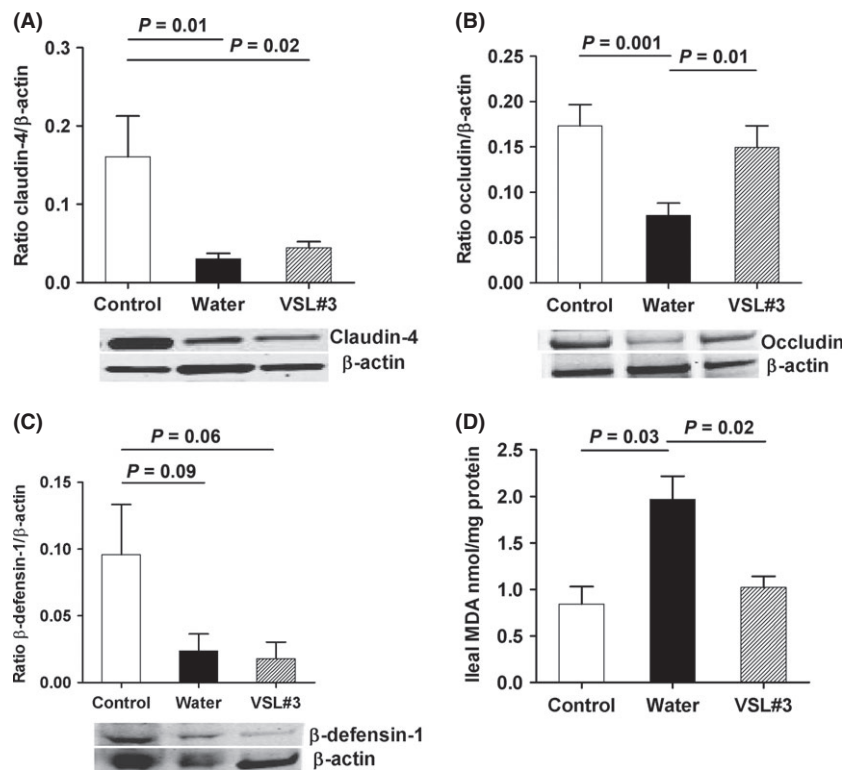


Fig. 5. Intestinal barrier in control rats (control group), cirrhotic rats treated with water (water group) and cirrhotic rats treated with VSL#3 (VSL#3 group). (A, B, and C) Western blot of ileal samples for claudin-4, occludin and β-defensin-1 respectively. (D) Ileal MDA levels. MDA: malondialdehyde.

findings could be because of a variety of factors. First, different probiotics can produce different effects in a given experimental or clinical situation (12, 15). Moreover, a combination of probiotics such as VSL#3 can result in a more marked effect than when a single strain is used (12–14, 18, 19). Second, in the studies that found negative results, probiotic treatment was started in stages of advanced cirrhosis in which ascites was already present, mimicking the situation of decompensated cirrhosis in humans, and the treatment was given for 8–10 days (6, 16). In the present study, VSL#3 administration began at week 6 of CCl₄ administration to mimic the setting of patients with advanced fibrosis or compensated cirrhosis (34), and treatment was given over 12 weeks to allow a more sustained effect of the probiotic.

The decrease in bacterial translocation in VSL#3-treated cirrhotic rats observed in the present study could be because of several non-excluding mechanisms: a decrease in intestinal bacterial overgrowth, an improvement in the intestinal barrier or modulation of immune response (1–3). Intestinal bacterial overgrowth is a key factor for bacterial translocation (1–3, 35). The bacteria translocated in our study were enterobacteria and enterococci, as reported in previous studies on the same experimental model (5, 6, 8–11, 29, 30, 35). However,

we found the intestinal concentration of these bacteria in cirrhotic rats was similar in those receiving VSL#3 and those receiving water. Previous studies in patients with inflammatory bowel disease have observed that VSL#3 increases the intestinal concentration of lactobacilli and bifidobacteria but does not produce significant changes in enterobacteria or enterococci (36, 37). Our findings suggest that the decrease in bacterial translocation observed in cirrhotic rats treated with VSL#3 was not because of changes in the intestinal concentration of the responsible bacteria.

Another mechanism that could contribute to pathological bacterial translocation is dysfunction of the intestinal barrier (1–3). Such dysfunction could be because of several factors, including alterations in tight junctions (1, 38). Few data on tight junction alterations in cirrhosis, however, are available (1, 38–41). Asmakopoulos *et al.* (39) described a decrease in the duodenal expression of the tight junctions occludin and claudin-1 in cirrhotic patients, mainly in those with decompensated cirrhosis. More recently, Du Plessis *et al.* (41) reported an increased expression of claudin-2, a pore-forming tight junction protein, in the duodenal mucosa of patients with cirrhosis and ascites.

In various experimental models, VSL#3 has been seen to improve the intestinal barrier. It decreases epithelial

permeability (20, 22) and increases mucin gene expression and secretion by colonic cells (21), defensin expression by enterocytes (42) and tight junction proteins expression in the colonic mucosa (20). We analysed several of these parameters previously reported to improve with VSL#3 treatment to determine their possible role in decreasing bacterial translocation. We observed a decrease in the ileal expression of the tight junction proteins occludin and claudin-4 in cirrhotic rats treated with water in comparison to control rats. The ileal expression of the antimicrobial peptide β -defensin-1 was also lower in the former group although it did not reach statistical significance. Interestingly, VSL#3 treatment restored the decreased occludin expression without significant changes in claudin-4, claudin-2 and β -defensin-1. Moreover, we observed a decrease in the oxidative damage in the ileum of cirrhotic rats treated with VSL#3. Intestinal oxidative damage has been associated with impairment in the intestinal barrier and delayed intestinal transit time (43, 44), a factor that also favours bacterial translocation (1–3). Our findings suggest that the increase in occludin expression and the decrease in oxidative damage in the intestinal barrier are relevant to explain the decrease in bacterial translocation observed with VSL#3 treatment at the dose and period of treatment used here.

VSL#3 treatment was associated with attenuation of the pro-inflammatory state characteristic of cirrhosis (2, 3), as observed by a decrease in TNF- α levels. This immune modulation could be because of the interaction between probiotic bacteria of VSL#3 and the immune system (19, 28, 45) and/or to the decrease in bacterial translocation by potentially pathogenic bacteria such as enterobacteria and enterococci (1–3, 46). Down-regulation of the pro-inflammatory state could in turn result in a decrease in bacterial translocation as has been observed in cirrhotic rats with ascites treated with anti-TNF- α monoclonal antibodies (47). Moreover, this down-regulation has been shown to reduce portal pressure in rats with partial vein ligation (48). In our study, cirrhotic rats treated with VSL#3 presented a decrease in the spleen/body weight ratio as a surrogate marker of portal pressure (29, 30) with respect to rats treated with water. It has been shown that adjunctive treatment with VSL#3 improves the effect of propranolol in decreasing the hepatic venous pressure gradient in cirrhotic patients undergoing primary prophylaxis of variceal bleeding (28). Moreover, a recent study reported that VSL#3 alone decreases the hepatic venous pressure gradient in patients with cirrhosis and ascites (49). The possible decrease in portal pressure could have contributed to the reduction in ileal oxidative damage and bacterial translocation observed in our study. This hypothesis is supported by the relationship between portal pressure, ileal MDA and bacterial translocation observed in this and in a previous study (30).

We found that cirrhotic rats treated with VSL#3 developed ascites less frequently than those treated with

water. This finding can be explained by the down-regulation of the pro-inflammatory state and the decrease in portal pressure estimated by the spleen/body weight ratio (2, 3, 29, 30). We observed that serum renin levels were lower in rats receiving VSL#3 than in those treated with water but this difference was not statistically significant. Our results are in line with previous studies showing that VSL#3 decreases plasma aldosterone levels (50) and improves hepatic and systemic haemodynamics (49) in patients with decompensated cirrhosis. These data suggest a beneficial effect of VSL#3 on portal, systemic and renal haemodynamics that would result in the lower ascites formation observed in VSL#3-treated rats.

Bacterial translocation and a pro-inflammatory state are relevant in promoting liver damage in liver diseases, including cirrhosis (1–3, 51). Activation of Kupffer cells and stellate cells is a key factor in this process (51). VSL#3 has shown to improve fibrosis in mice with experimental non-alcoholic steatohepatitis (23). In our study, however, in spite of the beneficial effects on bacterial translocation and the pro-inflammatory state, we did not observe any significant effect of VSL#3 on liver damage as assessed by the histological score and quantification of Kupffer and stellate cells. Moreover, although a decrease in estimated portal pressure and ascites formation in rats treated with VSL#3 suggests a reduction in liver fibrosis and intrahepatic resistance, we did not find differences between VSL#3 and water groups concerning collagen deposition and quantification of hepatic stellate cells. The possible beneficial effects of VSL#3 on liver damage were likely eliminated by the severity of toxic liver damage inherent to this experimental model in which rats received CCl₄ until the end of this study. Moreover, VSL#3 treatment began at week 6 of CCl₄ administration, when liver damage is already established (34). Moratalla *et al.* (33) also failed to observe a decrease in liver damage in mice with CCl₄-induced cirrhosis receiving *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 starting at week 11 of CCl₄ administration. Starting probiotic treatment earlier would perhaps have improved liver damage, as has recently been observed in rats with CCl₄-induced fibrosis receiving a symbiotic formulation throughout the whole 7 weeks of CCl₄ administration (52).

This study has several limitations. First, our results cannot be extrapolated to other situations, dosages or periods of treatment with VSL#3. It would be interesting to evaluate VSL#3 in an experimental setting mimicking decompensated cirrhosis, such as starting treatment when rats develop ascites. Second, we did not observe bacterial translocation by the bacteria included in VSL#3, but the methodology used did not specifically evaluate lactobacilli and bifidobacteria. However, no infections caused by these bacteria have been reported in patients with cirrhosis treated with VSL#3 (19, 24, 25, 28, 49, 50). Moreover, we did not

observe statistically significant changes with VSL#3 treatment in the intestinal concentration of the bacteria responsible for bacterial translocation (enterobacteria and enterococci) evaluated by microbiological culture. We cannot rule out other effects of VSL#3 on intestinal or mesenteric lymph nodes microbiota that could have been demonstrated using a more comprehensive evaluation (6, 11) including molecular techniques (37, 53). Finally, the beneficial effects of VSL#3 on bacterial translocation seem to be related, at least in part, to improvements in the intestinal barrier, as observed by the increase in ileal occludin concentration. It would be interesting to explore other mechanisms not evaluated here, such as intestinal permeability (20) and mucin expression (21).

In conclusion, our findings show that VSL#3, at the dose and for the period administered in the present study, decreases bacterial translocation, the pro-inflammatory state and ascites formation, but does not improve liver damage in rats with CCl₄-induced cirrhosis. The improvement in the integrity of the intestinal barrier seems to play a relevant role in these effects, but the precise mechanisms implicated deserve further research. VSL#3 could be useful in preventing complications in patients with cirrhosis.

Acknowledgements

The authors thank Cristina Millan for technical support and Carolyn Newey for English language assistance.

Financial support: This study was partially funded by VSL Pharmaceuticals Inc., Towson, MD, USA, and Instituto de Salud Carlos III (grant PI08/0262), Madrid, Spain. Silvia Vidal was supported by 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' and participant in the Program for Stabilization of Investigators of the 'Direcció d'Estrategia i Coordinació del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya'. Pau Sancho-Bru is funded by Instituto de Salud Carlos III, Miguel Servet (CP11/00071).

Conflict of interest: The authors do not have any disclosures to report.

References

1. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014; **60**: 197–209.
2. Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; **17**: 27–31.
3. Bellot P, Frances R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int* 2013; **33**: 31–9.
4. Shawcross DL, Shabbir SS, Taylor NJ, Hughes RD. Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2010; **51**: 1062–9.
5. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Selective intestinal decontamination with trimethoprim-sulfamethoxazole in an experimental model of cirrhosis in rats. *Dig Dis Sci* 1999; **44**: 1957–1862.
6. Bauer TM, Fernández J, Navasa M, Vila J, Rodés J. Failure of *Lactobacillus* spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002; **36**: 501–6.
7. Fernández J, Acevedo J, Castro M, *et al.* Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 2012; **55**: 1551–61.
8. Pérez-Páramo M, Muñoz J, Albillos A, *et al.* Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000; **31**: 43–8.
9. Lorenzo-Zúñiga V, Bartolí R, Planas R, *et al.* Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 2003; **37**: 551–7.
10. Pardo A, Bartolí R, Lorenzo-Zúñiga V, *et al.* Effect of cispripide on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2000; **31**: 858–63.
11. Chiva M, Soriano G, Rochat I, *et al.* Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002; **37**: 456–62.
12. Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, *et al.* An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* 2013; **62**: 787–96.
13. Jonkers D, Stockbrügger R. Review article: probiotics in gastrointestinal and liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; **26**(Suppl. 2): 133–48.
14. Lata J, Jurankova J, Kopacova M. Probiotics in hepatology. *World J Gastroenterol* 2011; **17**: 2890–6.
15. Sheth AA, García-Tsao G. Probiotics and liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2008; **42**(suppl. 2): S80–4.
16. Soriano G, Sánchez E, Guarner C, Schiffrin E. *Lactobacillus johnsonii* La1 without antioxidants do not decrease bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol* 2012; **57**: 1395–6.
17. Wiest R, Chen F, Cadelina G, Groszmann RJ, García-Tsao G. Effect of *Lactobacillus*-fermented diets on bacterial translocation and intestinal flora in experimental prehepatic portal hypertension. *Dig Dis Sci* 2003; **48**: 1136–41.
18. Liu Q, Duan ZP, Ha DK, *et al.* Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2004; **39**: 1441–9.
19. Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, *et al.* Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol* 2005; **39**: 540–3.
20. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, *et al.* Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; **296**: G1140–9.
21. Caballero-Franco C, Keller K, De Simone C, Chadee K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; **292**: G315–22.
22. Madsen K, Cornish A, Soper P, *et al.* Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001; **121**: 680–591.
23. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, *et al.* VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in ste-

- atohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology* 2009; **49**: 989–97.
24. Agrawal A, Sharma BC, Sharma P, Sarin SK. Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: an open-label, randomized controlled trial of lactulose, probiotics, and no therapy. *Am J Gastroenterol* 2012; **107**: 1043–50.
 25. Lunia MK, Sharma BC, Sharma P, Sachdeva S, Srivastava S. Probiotics prevent hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a randomized controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; DOI: 10.1016/j.cgh.2013.11.006. [Epub ahead of print].
 26. Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA. A rodent model of cirrhosis, ascites and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991; **100**: 489–93.
 27. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994; **21**: 792–6.
 28. Gupta N, Kumar A, Sharma P, et al. Effects of the adjunctive probiotic VSL#3 on portal haemodynamics in patients with cirrhosis and large varices: a randomized trial. *Liver Int* 2013; **33**: 1148–57.
 29. García-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1835–41.
 30. Chiva M, Guarner C, Peralta C, et al. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; **15**: 145–50.
 31. Closa D, Bulbena O, Roselló-Catafau J, Fernández-Cruz L, Gelpí E. Effect of prostaglandins and superoxide dismutase administration on oxygen free radical production in experimental acute pancreatitis. *Inflammation* 1993; **17**: 563–71.
 32. Rossi G, Nigro G, Tattoli I, et al. Adhesion molecules and cytokine profile in ileal tissue of sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect* 2009; **11**: 698–706.
 33. Moratalla A, Gómez-Hurtado I, Santacruz A, et al. Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2013; DOI: 10.1111/liv.12380. [Epub ahead of print].
 34. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982; **83**: 1183–90.
 35. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997; **26**: 1372–8.
 36. Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; **13**: 1103–8.
 37. Kühbacher T, Ott SJ, Helwig U, et al. Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut* 2006; **55**: 833–41.
 38. Pijls KE, Jonkers DM, Elamin EE, Masclee AA, Koek GH. Intestinal epithelial function in liver cirrhosis: an extensive review of the literature. *Liver Int* 2013; **33**: 1457–69.
 39. Asmakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis G, et al. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur J Clin Invest* 2012; **42**: 439–46.
 40. Yang DH, Ye ZY, He XJ, Xu WJ, Zhou WM. Effect of salivianolate on intestinal epithelium tight junction protein zonula occludens protein 1 in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 7040–7.
 41. Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CE, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol* 2013; **58**: 1125–32.
 42. Schlee M, Harder J, Koten B, et al. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin Exp Immunol* 2008; **151**: 528–35.
 43. Bielefeldt K, Conklin JL. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation *in vitro*. *Dig Dis Sci* 1997; **42**: 878–84.
 44. Ramachandran A, Prabhu R, Thomas S, et al. Intestinal mucosal alterations in experimental cirrhosis in the rat: role of oxygen free radicals. *Hepatology* 2002; **35**: 622–9.
 45. Esposito E, Iacono A, Blanco G, et al. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr* 2009; **139**: 905–11.
 46. Wiest R, Das S, Cadelina G, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1223–33.
 47. Francés R, Chiva M, Sánchez E, et al. Bacterial translocation is downregulated by an anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007; **46**: 797–803.
 48. López-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995; **108**: 761–7.
 49. Rincón D, Vaquero J, Hernando A, et al. Oral probiotics VSL#3 attenuates the circulatory disturbances of patients with cirrhosis and ascites. *Liver Int* 2014; DOI: 10.1111/liv.12539. [Epub ahead of print].
 50. Jayakumar S, Carbonneau M, Hotte N, et al. VSL#3 probiotic therapy does not decrease portal pressures in patients with decompensated cirrhosis. *Liver Int* 2013; **33**: 1470–7.
 51. Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol* 2012; **590**: 447–58.
 52. D'Argenio G, Cariello R, Tuccillo C, et al. Symbiotic formulation in experimentally induced liver fibrosis in rats: intestinal microbiota as a key point to treat liver damage. *Liver Int* 2013; **33**: 687–97.
 53. Cuenca S, Sanchez E, Santiago A, et al. Microbiome composition by pyrosequencing in mesenteric lymph nodes of rats with CCl4-induced cirrhosis. *J Innate Immun* 2013; **6**: 263–71.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Methods: Immunohistochemical tests.

Figure S1. Liver sections showing the degree of liver damage assessed by haematoxylin-eosin stains: (A) control rat, (B) cirrhotic rat treated with water and (C) cir-

rhotic rat treated with VSL#3; and Sirius red staining: (D) control rat, (E) cirrhotic rat treated with water and (F) cirrhotic rat treated with VSL#3. Bar = 200 μ m.

Figure S2. Liver sections showing distribution of macrophages reacting to CD68 (arrow-heads) in: (A) control rat, (B) cirrhotic rat treated with water and (C) cirrhotic rat treated with VSL#3. Positive Kupffer cells are overexpressed along the sinusoids but particularly in periportal areas of all cirrhotic rats. The same liver sections showing hepatic stellate cells reacting to desmin

(arrows and arrow-heads) in: (D) control rat, (E) cirrhotic rat treated with water and (F) cirrhotic rat treated with VSL#3. There was an increase in hepatic stellate cells in cirrhotic rats treated with water and in cirrhotic rats treated with VSL#3 compared to control rats. Note the fusate to stellate morphology of perisinusoidal hepatic stellate cells (E and F, arrows) to respect round shaped hepatic stellate cells in periportal spaces (D and E, arrow-heads). Immunohistochemistry, counterstained with haematoxylin. Bar = 200 μ m.

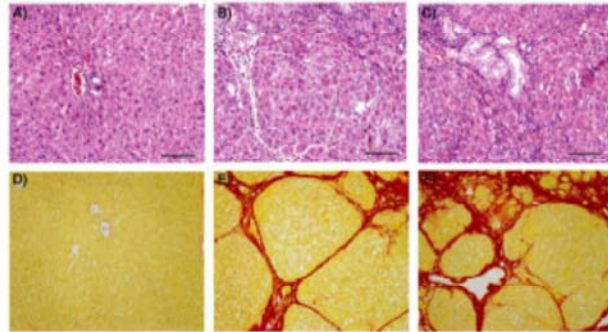


Figure 5. Liver sections showing the degree of liver damage assessed by hematoxylin-eosin stains: A) control rat, B) cirrhotic rat treated with water, and C) cirrhotic rat treated with VSL#3; and Sirius red staining: D) control rat, E) cirrhotic rat treated with water, and F) cirrhotic rat treated with VSL#3. Bar = 200 μ m

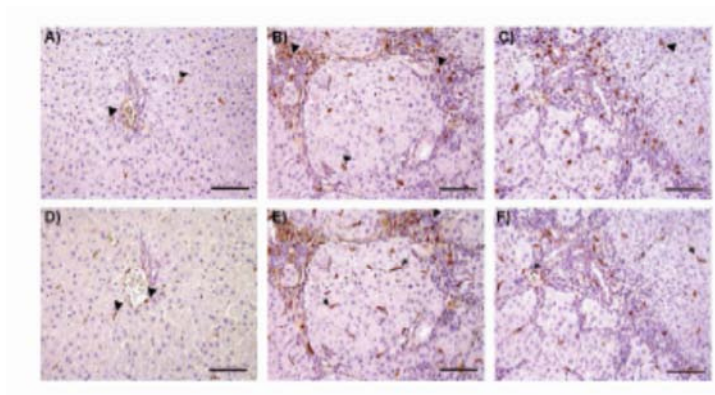


Figure 6. Liver sections showing distribution of macrophages reacting to CD68 (arrow-heads) in: A) control rat, B) cirrhotic rat treated with water, and C) cirrhotic rat treated with VSL#3. Positive Kupffer cells are overexpressed along the sinusoids but particularly in periportal areas of all cirrhotic rats. The same liver sections showing hepatic stellate cells reacting to desmin (arrows and arrow-heads) in: D) control rat, E) cirrhotic rat treated with water, and F) cirrhotic rat treated with VSL#3. There was an increase in hepatic stellate cells in cirrhotic rats treated with water and in cirrhotic rats treated with VSL#3 compared to control rats. Note the fusate to stellate morphology of perisinusoidal hepatic stellate cells (E and F, arrows) to respect round shaped hepatic stellate cells in periportal spaces (D and E, arrow-heads). Immunohistochemistry, counterstained with hematoxylin. Bar = 200 μ m

5. SÍNTESIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Artículo I

Cytokine production in patients with cirrhosis and TLR4 polymorphisms.

Nieto JC, Sánchez E, Román E, Vidal S, Oliva L, Guarner- Argente C, Poca M, Torras X, Juárez C, Guarner C, Soriano G.

World Journal of Gastroenterology. 2014; 20(46): 17516-24.

Síntesis de Resultados

Como consecuencia de la translocación bacteriana y las alteraciones en la respuesta inmune, los pacientes con cirrosis esta predispuestos a desarrollar infecciones causadas por bacterias entéricas. Los PAMPs, en estas bacterias, son reconocidos por receptores TLRs que se encuentran principalmente en la superficie de los leucocitos. Cuando esto ocurre, los TLRs desencadenan la respuesta inflamatoria. Soriano et al., previamente, describieron que pacientes con cirrosis con el del TLR4 D299G estaban más predispuestos a desarrollar infecciones bacterianas y encefalopatía hepática que los pacientes que no presentaban el polimorfismo. Una posible explicación de estos hallazgos puede ser que la respuesta inflamatoria en pacientes que presentan el polimorfismo de TLR4 es diferente de los pacientes que no tienen el polimorfismo.

Este estudio se ha diseñado para comparar la producción de citocinas de las células de sangre periférica de pacientes con cirrosis con los polimorfismos del TLR4 D299G y/o T399I y de pacientes sin ninguno de estos dos polimorfismos.

Para el estudio se hizo el *screening* de 258 pacientes hospitalizados por cirrosis con ascitis. Se detectó el polimorfismo de TLR4 D299G y/o T399I en 28 pacientes (11%). A partir de aquí, el estudio se realizó entre Febrero de 2009 y Julio de 2011 y el seguimiento incluyó pacientes que presentaban el polimorfismo y que durante este tiempo sobrevivieron, no recibieron trasplante hepático y cumplían todos los criterios de inclusión. El grupo de pacientes sin el polimorfismo (*wild type*) fue pareado por edad, sexo y el grado de fallo hepático con pacientes cirróticos que

tenían los polimorfismos. Todos los pacientes eran cirróticos caucásicos y el diagnóstico de cirrosis se hizo por biopsia hepática o por hallazgos clínicos, analíticos y por ecografía. Todos los pacientes habían tenido algún episodio de descompensación de la cirrosis o habían padecido al menos una descompensación previa. Los pacientes incluidos en el estudio venían al hospital por visitas de control o para someterse a una paracentesis terapéutica. Los criterios de exclusión fueron virus de la inmunodeficiencia humana, tratamiento con fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores, carcinoma hepatocelular u otra neoplasia, alcohol activo en el año previo, trasplante hepático y algún tipo de infección activa o cualquier otro tipo de descompensación de la cirrosis en el mes previo al inicio del seguimiento. Se incluyó un grupo de donantes sanos caucásicos para comparar su producción de citocinas con la de los pacientes cirróticos incluidos.

De los 28 pacientes con los polimorfismos TLR4 D299G y/o T399I, 19 no fueron incluidos por las siguientes causas: 8 murieron antes del inicio del estudio, 2 pacientes recibieron trasplante hepático, 6 no volvieron a las visitas después de la salida de hospitalización, 2 desarrollaron carcinoma hepatocelular y 1 presentó macroglobulinemia. Así, 9 pacientes con cirrosis y con alguno de los polimorfismos fueron incluidos en el estudio y comparados con 10 pacientes con cirrosis sin ninguno de los polimorfismos. Además, estos dos grupos fueron comparados con donantes sanos.

Al comparar las características clínicas de los 2 grupos de pacientes, la incidencia y el número de episodios de encefalopatía hepática fue significativamente mayor en el grupo con polimorfismo que en el grupo *wild-type*. No se encontraron diferencias significativas en los demás parámetros clínicos evaluados entre los dos grupos.

En el contexto de la cirrosis, la endotoxemia podría ser una consecuencia de la deficiente respuesta celular a las endotoxinas, lo que a su vez incrementaría los niveles de LBP. Este defecto en la respuesta y en la eliminación de endotoxinas podría estar asociado al polimorfismo en el TLR4. Para confirmar esta hipótesis, se evaluaron los niveles de LBP en el grupo con polimorfismos, en el grupo *wild-type* y en el grupo de donantes sanos. Se observó una tendencia a unos mayores niveles de LBP en el plasma de pacientes con cirrosis que en el grupo de donantes sanos

y el grupo de pacientes con polimorfismos presentaron una tendencia a mayores niveles de LBP en plasma que el grupo *wild-type*.

Para determinar la influencia de los polimorfismos de TLR4 en la producción de citocinas, primero, se comparó la producción de citocinas de las células de sangre periférica en cultivos de 24 horas de sangre total, sin estimular y estimulados con ligandos de TLRs (LPS y LTA) entre los pacientes con cirrosis y el grupo de donantes sanos. La producción espontánea de TNF- α e IL-6 en los pacientes con cirrosis fue significativamente mayor que en el grupo de donantes sanos. La producción de TNF- α después de la estimulación con LTA, y, la producción de IL-6 después de la estimulación con LPS y LTA fue significativamente mayor en los pacientes con cirrosis que en el grupo de donantes sanos.

Al evaluar la producción de citocinas entre el grupo de pacientes con polimorfismos y el grupo *wild-type*, encontramos que en el grupo del polimorfismo había una tendencia a una menor producción espontánea de TNF- α y una producción significativamente menor de IL-6 e IL-10 que en el grupo *wild-type*. La producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 después de la estimulación con LPS y LTA fue similar entre los dos grupos. Sin embargo, el incremento en la producción de citocinas con respecto a la producción espontánea fue significativamente mayor en el grupo del polimorfismo que en el grupo *wild-type*.

Discusión y relevancia

El principal hallazgo de nuestro estudio, es que las células de sangre periférica de pacientes con cirrosis y que tienen los polimorfismos de TLR4 D299G y/o T399I, espontáneamente producen menos IL-6 e IL-10 que los pacientes con cirrosis que no tenían ninguno de los polimorfismos, pero presentan niveles similares de producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 después de la estimulación con ligandos de TLRs. Esto coincide con el estado pro-inflamatorio descrito previamente en la cirrosis y que está relacionado con la translocación bacteriana y los niveles incrementados de endotoxinas.

Estas diferencias en el perfil de producción de citocinas expresadas en nuestros grupos de pacientes, puede explicar algunas asociaciones descritas entre el polimorfismo en el TLR4 y el desarrollo de complicaciones en la cirrosis. El hecho de que haya niveles mas bajos de producción de citocinas de manera espontánea en los pacientes que tienen algún polimorfismo comparado con el grupo que no presenta polimorfismos, refleja un menor estado pro-inflamatorio basal *in vivo*, lo que explicaría la predisposición de los pacientes con el polimorfismo al desarrollo de infecciones bacterianas y a su vez, el papel protector del polimorfismo contra la progresión de la enfermedad hepática.

Artículo II

Impaired innate immune response of leukocytes from ascitic fluid of patients with spontaneous bacterial peritonitis

Juan Camilo Nieto, Elisabet Sánchez, Cristina Romero, Eva Román, Maria Poca, Carlos Guarner, Cándido Juárez, Germán Soriano, Silvia Vidal.

Journal of Leukocyte Biology. Epub ahead of print August 7, 2015-
doi:10.1189/jlb.3AB0315-106R

Síntesis de Resultados.

La peritonitis bacteriana espontánea (PBE) es una de las complicaciones más graves que padecen los pacientes con cirrosis. La PBE se origina cuando bacterias vivas cruzan la barrera intestinal en un proceso conocido como translocación bacteriana. Una vez han cruzado, las bacterias llegan a los ganglios mesentéricos y de allí entran a la circulación sistémica y al líquido ascítico en la cavidad peritoneal, como consecuencia de la hipertensión portal y la cirrosis avanzada. Cuando se da esta complicación, el microambiente que se genera en el líquido ascítico puede condicionar la respuesta inmune de las células de los pacientes. En este estudio, comparamos el contenido inflamatorio en líquido ascítico de pacientes sin PBE (ascitis estéril, SA), de pacientes en el momento del diagnóstico de la PBE y de pacientes después del tratamiento antibiótico y la resolución de la PBE. Tuvimos en cuenta las dos diferentes variantes de PBE: PBE con cultivo positivo bacteriano (PosC-SBP) y PBE con cultivo negativo bacteriano (NegC-SBP). Para esto, analizamos la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 y estudiamos la asociación de los niveles de citocinas con la composición celular y función celular. Además analizamos la expresión de marcadores de superficie en los macrófagos del líquido ascítico. Estos marcadores fueron seleccionados de acuerdo a su contribución con los mecanismos de la inmunidad innata: la presentación antigénica (HLA-DR), la fagocitosis (CD16, CD64), *scavenger receptors* (CD36, CD163) y activación celular (CD11b, CD86). Por último, como la respuesta inmune innata de los pacientes con

PBE después del tratamiento es aún poco estudiada, comparamos la fagocitosis, el estallido oxidativo, y la expresión de marcadores en los monocitos de la SA, PosC-SBP y NegC-SBP antes y después del tratamiento antibiótico.

Al analizar la concentración de TNF- α , IL-6 e IL-10 en el líquido ascítico, no encontramos diferencias significativas en los niveles de TNF- α entre los 3 grupos de pacientes analizados al momento del diagnóstico (pacientes con SA, PosC-SBP y NegC-SBP). Después del tratamiento los niveles de TNF- α disminuyeron significativamente solamente en el grupo de PosC-SBP. Los niveles de IL-6, antes del tratamiento en PosC-SBP y NegC-SBP fueron significativamente mayores que en el grupo SA. Este hecho era esperable, ya que la PBE ya ha sido asociada con una elevada producción de mediadores inflamatorios. Además, altos niveles de IL-6 y otros mediadores inflamatorios han sido considerados marcadores de diagnóstico de la PBE. Después del tratamiento, los niveles de IL-6 disminuyeron en los 2 grupos PosC-SBP y NegC-SBP a niveles similares al grupo SA. Los niveles de IL-10 en el momento del diagnóstico fueron significativamente mayores en PosC-SBP y en NegC-SBP que en el grupo SA y disminuyeron en los 2 grupos después del tratamiento. También observamos que los niveles de IL-6 correlacionaban positivamente con los niveles de IL-10. Podría ser una consecuencia de la capacidad que tiene la IL-6 de inducir la IL-10.

Al comparar los niveles de citocinas con el contenido celular del líquido ascítico encontramos que los niveles de IL-6 se correlacionaban significativamente con el porcentaje de neutrófilos del líquido ascítico, que era mayor en el PosC-SBP y NegC-SBP que en el grupo SA. Esta correlación se podría explicar por la producción de IL-6 por parte de los neutrófilos que han sido reclutados en el contexto de la PBE. También se ha descrito a la IL-6 como un regulador del tráfico de neutrófilos, ya que dirige la producción de quimiocinas atrayentes de neutrófilos. Después del tratamiento, el número de neutrófilos disminuyó significativamente en los grupos PosC-SBP y NegC-SBP hasta alcanzar niveles del grupo SA. Aunque encontramos un gran porcentaje de neutrófilos en los grupos con PBE, estas células tenían una capacidad de estallido respiratorio defectuosa si se comparaba con la capacidad de los neutrófilos del grupo SA. Después del tratamiento solo los neutrófilos del grupo NegC-SBP recuperaron la función de estallido respiratorio hasta niveles similares a los neutrófilos del grupo SA.

La elevada producción de citocinas se asociaba con el fenotipo y la función de los macrófagos del líquido ascítico de los pacientes con cirrosis. Los niveles de IL-10 en el líquido ascítico se correlacionaban con la frecuencia de macrófagos que presentaban baja granularidad. Además en el momento del diagnóstico, los líquidos ascíticos de pacientes de PosC-SBP y NegC-SBP tenían mayor porcentaje de macrófagos con baja granularidad que los del grupo SA. Es posible que este fenómeno se deba a la producción de IL-6 que precede a la producción de IL-10. A su vez, se inducirían quimiocinas y un desequilibrio hemodinámico que facilita el reclutamiento de monocitos circulantes a la zona peritoneal (estos tendrían menos granularidad que los macrófagos residentes). Después del tratamiento, el porcentaje de macrófagos con baja granularidad de los grupos con PBE fue similar al grupo SA. Los macrófagos de PosC-SBP y NegC-SBP al momento del diagnóstico, tenían menor expresión de CD14 en la superficie en comparación que los macrófagos del grupo SA. En este estudio se observó que los macrófagos del PosC-SBP tenían niveles de expresión de CD14 y de granularidad comparable a los de un monocito de sangre periférica, esto podría ser debido a que durante la infección del líquido ascítico en PosC-SBP,

El particular ambiente generado en el líquido ascítico durante la translocación bacteriana e infección, induce un fenotipo específico que se refleja en un cambio en la función de los macrófagos; por ello observamos una fuerte correlación entre la expresión de CD14 y la capacidad de fagocitosis de las células. Los macrófagos de PosC-SBP y NegC-SBP tenían un defecto en la fagocitosis que se corrigió después del tratamiento en el grupo NegC-SBP, alcanzando los niveles del grupo SA. Este defecto implicaría que en el líquido ascítico de los pacientes con PosC-SBP las bacterias no puedan ser destruidas fácilmente y por ello, este grupo de pacientes presentaría mayor recurrencia de infecciones del líquido ascítico.

En relación con el fenotipo de los macrófagos, en el momento del diagnóstico, encontramos que los niveles de CD11b y CD86 fueron significativamente más bajos en PosC-SBP y NegC-SBP que en el grupo SA. Los niveles de HLA-DR, CD16 y CD206 fueron significativamente más bajos en el grupo PosC-SBP que en el grupo SA. En cambio, los marcadores CD64, CD36 y el CD163 fueron similares en los 3 grupos de pacientes. Después del tratamiento los niveles de CD86 incrementaron

alcanzando los niveles del grupo SA. También los niveles de HLA-DR, CD16, CD64, CD36 y CD206 en PosC-SBP se incrementaron.

Discusión y relevancia.

En este estudio se demuestra, que eliminando la bacteria con el tratamiento antibiótico, los leucocitos presentes en el líquido ascítico vuelven a la homeostasis y expresan un fenotipo distinto. Este tratamiento recupera el estatus funcional de los neutrófilos y los macrófagos de NegC-SBP, pero no es suficiente para que los macrófagos de PosC-SBP recuperen la funcionalidad.

Es posible que este defecto se deba a un diferente estado de maduración de los macrófagos de PosC-SBP y NegC-SBP en el momento del diagnóstico. También existe la posibilidad que la presencia de más bacterias viables en PosC-SBP que en NegC-SBP requiera un tratamiento con antibiótico mas agresivo o durante mas tiempo para eliminar la infección. Otra posible explicación a este fenómeno es que en ausencia o presencia de bacterias viables (y sus productos) se produzcan mediadores inflamatorios diferentes en el líquido ascítico que modularían el fenotipo y la función de los macrófagos de manera distinta.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que un análisis extensivo del estado inmune de los componentes leucocitarios del líquido ascítico, podría ayudar a entender la fisiopatología de la infección del líquido ascítico y optimizar el tratamiento de los pacientes.

Artículo III

VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrosis

Elisabet Sánchez*, **Juan C. Nieto***, Ana Boullosa, Silvia Vidal, Francesc J. Sancho, Giacomo Rossi, Pau Sancho-Bru, Rosa Homs, Beatriz Mirelis, Caándido Juárez, Carlos Guarner, Germán Soriano.

Liver International 2014

*Los autores contribuyeron de igual manera en la publicación.

Síntesis de resultados.

La translocación bacteriana patológica juega un papel relevante en la cirrosis, no solamente por favorecer el desarrollo de infecciones bacterianas, sino que también por el mantenimiento del estado pro-inflamatorio, en el paciente. Este estado está relacionado con las demás complicaciones de la cirrosis, como la ascitis. Con el fin de prevenir la translocación bacteriana en este tipo de pacientes se han probado diferentes estrategias en un modelo experimental de cirrosis. Se induce la cirrosis en ratas con tetracloruro de carbono (CCl₄). El tratamiento de las ratas de este modelo con antibióticos disminuye eficazmente la translocación bacteriana. Sin embargo los antibióticos favorecen el desarrollo de resistencias bacterianas, especialmente cuando se administran por largas temporadas. Se han propuesto diferentes alternativas a este tratamiento, por ejemplo los probióticos. Se ha demostrado que los probióticos pueden prevenir la translocación bacteriana disminuyendo el sobrecrecimiento bacteriano intestinal además de mejorar la barrera intestinal y el desequilibrio en la respuesta inmune. Dentro de los probióticos estudiados en las patologías de tipo digestivo encontramos el VSL#3. El VSL#3 es una preparación probiótica que contiene una mezcla de ocho diferentes especies de bacterias vivas (principalmente del género lactobacili y bifidobacteria). Se ha demostrado que VSL#3 mejora la barrera intestinal en diferentes modelos animales y es utilizado en el manejo de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos del VSL#3 en la translocación bacteriana, la flora intestinal, la barrera intestinal y la respuesta inflamatoria en el modelo experimental de rata con cirrosis inducida por CCl₄.

Diseño experimental

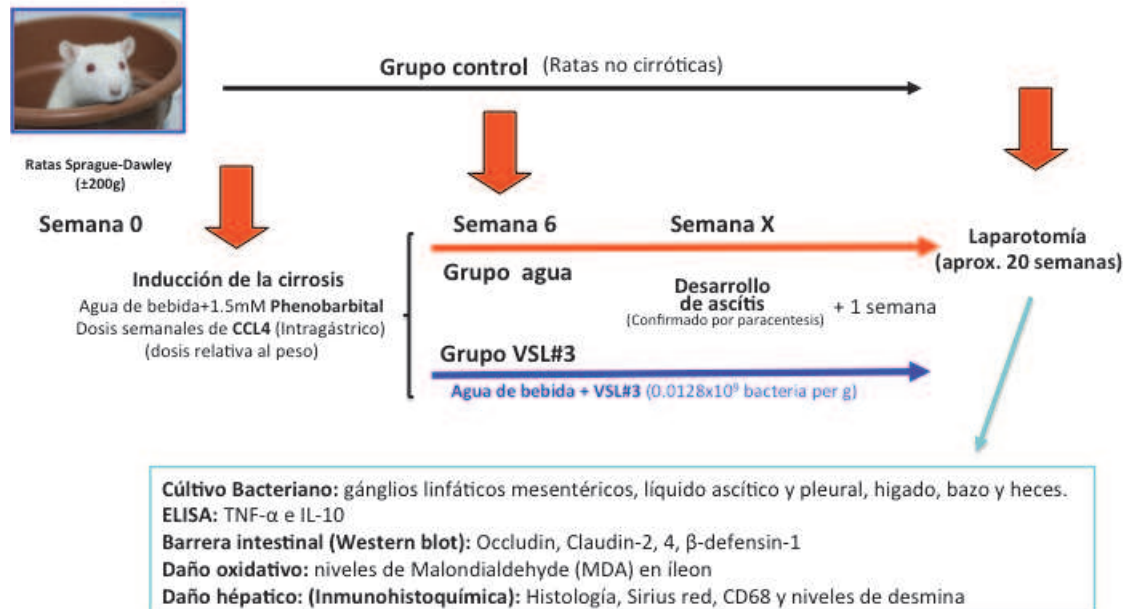


Figura 10. Diseño experimental del modelo de rata con CCl₄

En el modelo de rata descrito en la Figura 10 observamos que la administración del VSL#3 no redujo la mortalidad. Sin embargo disminuyó a la mitad la probabilidad de que las ratas desarrollaran ascitis (demostrado por la paracentesis antes de la semana 20) en el grupo de ratas que bebían VSL#3 diluida en agua (grupo VSL#3) cuando se comparaba con el grupo que solo bebía agua (grupo agua).

Al analizar la incidencia de translocación bacteriana, observamos que era significativamente menor en el grupo VSL#3 que en el grupo agua. *Escherichia coli* y *Enterococcus spp* fueron las bacterias detectadas en las ratas con translocación y fueron principalmente detectadas en los ganglios linfáticos mesentéricos.

Al evaluar el cambio que podría originar la administración del VSL#3 en la microbiota fecal en los tres grupos, observamos que los dos grupos de ratas cirróticas (VSL#3 y agua), presentaban mayor carga de bacterias que las ratas sanas (grupo control). No hubo diferencias al comparar los grupos VSL#3 y el grupo agua en ninguna de las determinaciones microbiológicas realizadas.

Cuando analizamos la repercusión del VSL#3 sobre el daño hepático causado por la cirrosis, encontramos que los dos grupos de ratas con cirrosis tenían la presencia de una fibrosis severa comparado con el grupo control, sin embargo entre el grupo VSL#3 y el grupo agua no hubo diferencias histológicas en el grado de cirrosis. Además el análisis inmunohistoquímico reveló que en los dos grupos de ratas cirróticas se encontraba aumentado el número de las células de Kupffer (CD68) y las células estrelladas (desmina), con respecto al grupo control, pero no había diferencias entre el grupo VSL#3 y el grupo agua.

En relación a la respuesta inflamatoria, las ratas del grupo VSL#3 presentaban niveles más bajos de TNF- α , pero no de IL-10, en el suero que las ratas del grupo agua. Los niveles de TNF- α e IL-10 en el grupo agua fueron mayores que en el grupo control. En cambio solamente los niveles de IL-10, pero no los de TNF- α , en el grupo VSL#3 fueron mayores que en el grupo control.

Cuando analizamos el efecto de la administración de VSL#3 sobre la barrera intestinal, observamos que habían una mayor expresión de ocludina en el íleon del grupo VSL#3 que en el grupo agua y una menor expresión de ocludina en el grupo agua que en el grupo control. Además los niveles de MDA en el íleon del grupo VSL#3 fueron menores que en el grupo agua y mayores en el grupo agua que en el grupo control. También había una correlación positiva entre los niveles de MDA y la presión portal evaluada por la ratio bazo/peso rata en todas las ratas cirróticas. Los niveles de MDA fueron mayores en las ratas con translocación bacteriana comparado con las m.

Discusión y relevancia.

En este estudio, cuando las ratas con cirrosis inducida por CCl₄ tomaron VSL#3, en la dosis y periodo indicado, disminuyó la translocación bacteriana, el estado pro-inflamatorio y la formación de ascitis, pero no hubo una mejoría en el daño hepático. La mejoría de la integridad de la barrera intestinal parece que desempeña un papel relevante en estos efectos beneficiosos del VSL#3, pero los mecanismos precisos necesitan aun de más investigación. Una de las directas consecuencias de nuestras

observaciones es que el VSL#3 podría ser considerado como un tratamiento adecuado en la prevención de las complicaciones en pacientes con cirrosis.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Los niveles séricos de citocinas en los pacientes con cirrosis son mayores que en los donantes sanos. Este resultado puede ser consecuencia de la endotoxemia generalizada de estos pacientes.
2. Hay una respuesta disminuida en los pacientes portadores de polimorfismos en TLR4. Esta disminución se observa a nivel de producción espontánea de IL-6 e IL-10.
3. Existe una relación entre las complicaciones de la cirrosis y la presencia de polimorfismos en TLR4, posiblemente ligada a la deficiente producción de citocinas.
4. En el líquido ascítico de los pacientes con cirrosis, los niveles de citocinas dependen de la presencia de infecciones y del momento del tratamiento.
5. Los niveles de IL-6 se relacionan directamente con el porcentaje de neutrófilos, que tienen una función bactericida disminuida en el momento del diagnóstico.
6. La eliminación de bacterias por el tratamiento con antibióticos reduce los niveles de IL-6 en las PBE de cultivo positivo y negativo, pero no puede recuperar la función bactericida de los neutrófilos en los líquidos ascíticos de PBE de cultivo positivo.
7. El fenotipo de los macrófagos del líquido ascítico estéril es compatible con el fenotipo de macrófagos residentes M2 de la cavidad peritoneal.
8. La morfología y fenotipo de los macrófagos del líquido ascítico depende del tipo de PBE y cambia después del tratamiento con antibióticos hacia un perfil similar al de la ascitis estéril

9. La concentración de IL-10 en los líquidos ascíticos esta relacionada con el tipo de macrófago que encontramos en la cavidad peritoneal.

10. El probiótico VSL#3 disminuye el estado pro-inflamatorio sistémico debido a la posible interacción de las bacterias del probiótico VSL#3 con el sistema inmune y/o la disminución de la translocación de bacterias patogénicas como enterobacterias y enterococos.

11. Aunque el tratamiento con el probiótico VSL#3 no mejora el daño hepático tiene un papel relevante en la integridad de la barrera intestinal: disminuye el daño oxidativo ileal e incrementa la expresión de ocludinas en el íleon en modelo experimental de cirrosis hepática inducida por CCl₄. En consecuencia disminuye la translocación bacteriana.

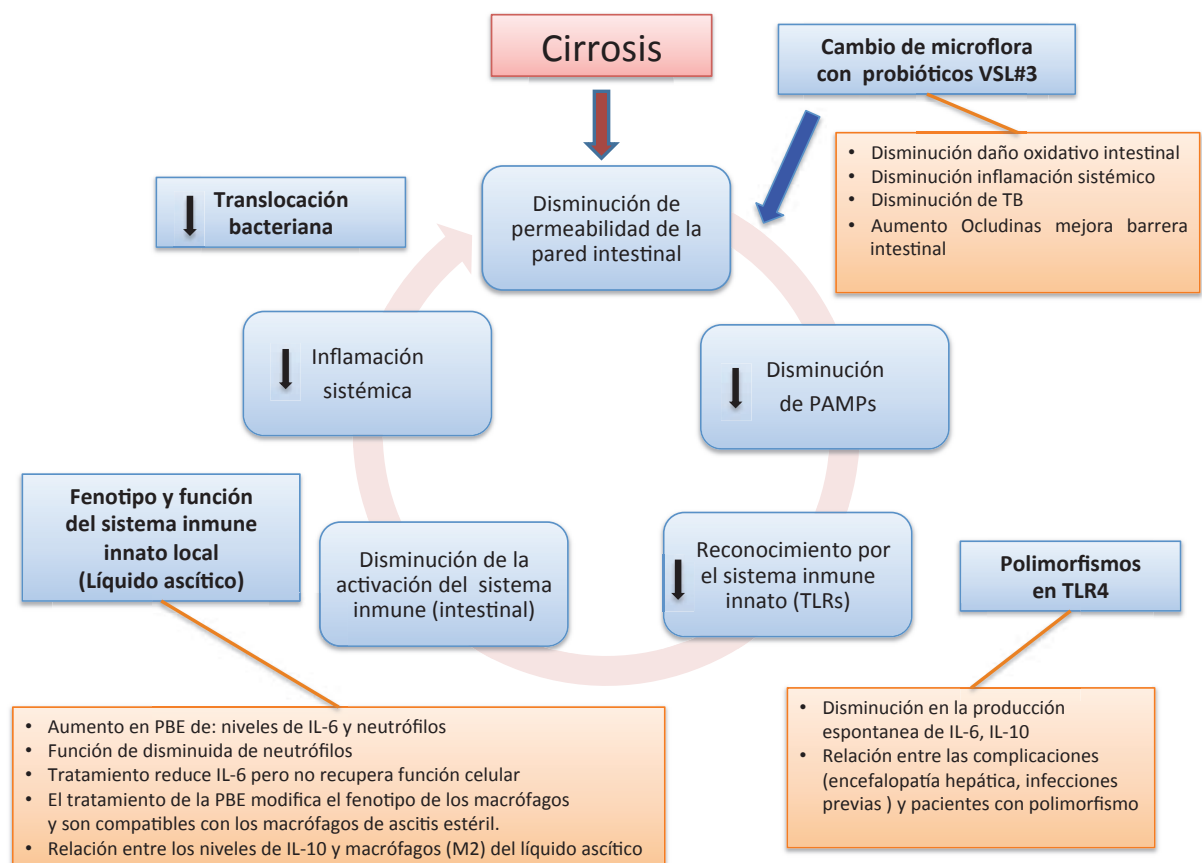


Figura 11. Esquema final del modelo presentado en la hipótesis con los resultados más relevantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.
2. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313-1318.
3. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001;13:114-119.
4. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 1998;10:351-353.
5. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-826.
6. Lawson KA, Pedersen RA. Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. *Ciba Found Symp* 1992;165:3-21; discussion 21-26.
7. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000;404:193-197.
8. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
9. Kumar S, Ingle H, Prasad DV, Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol* 2013;39:229-246.
10. Fadeel B. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13609.
11. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002;168:4531-4537.
12. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol* 2011;29:185-214.
13. Werling D, Coffey TJ. Pattern recognition receptors in companion and farm animals - the key to unlocking the door to animal disease? *Vet J* 2007;174:240-251.
14. Kruthof EK, Satta N, Liu JW, Dunoyer-Geindre S, Fish RJ. Gene conversion limits divergence of mammalian TLR1 and TLR6. *BMC Evol Biol* 2007;7:148.
15. Tang D, Gao Y, Wang R, Sun Y, Xu T. Characterization, genomic organization, and expression profiles of MyD88, a key adaptor molecule in the TLR signaling pathways in miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Fish Physiol Biochem* 2012;38:1667-1677.

16. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007;7:179-190.
17. Nemazee D, Gavin A, Hoebe K, Beutler B. Immunology: Toll-like receptors and antibody responses. *Nature* 2006;441:E4; discussion E4.
18. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 2010;11:395-402.
19. Chang M, Collet B, Nie P, Lester K, Campbell S, Secombes CJ, Zou J. Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Virol* 2011;85:8403-8412.
20. Manavalan B, Basith S, Choi S. Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol* 2011;2:41.
21. Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000;67:508-514.
22. Abdullah Z, Knolle PA. Scaling of immune responses against intracellular bacterial infection. *EMBO J* 2014;33:2283-2294.
23. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001;1:625-635.
24. Trejo-de la OA, Hernandez-Sancen P, Maldonado-Bernal C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun* 2014;15:199-209.
25. Shinkai H, Muneta Y, Suzuki K, Eguchi-Ogawa T, Awata T, Uenishi H. Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: complete sequencing of genomic region and expression analysis. *Mol Immunol* 2006;43:1474-1480.
26. Toka FN, Nfon CK, Dawson H, Golde WT. Accessory-cell-mediated activation of porcine NK cells by toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR8 agonists. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:866-878.
27. Govindaraj RG, Manavalan B, Basith S, Choi S. Comparative analysis of species-specific ligand recognition in Toll-like receptor 8 signaling: a hypothesis. *PLoS One* 2011;6:e25118.
28. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001;13:85-94.
29. Werling D, Jungi TW. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;91:1-12.
30. Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, et al. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 1998;24:340-355.

31. Miyake K. Endotoxin recognition molecules MD-2 and toll-like receptor 4 as potential targets for therapeutic intervention of endotoxin shock. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3:291-297.
32. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-1782.
33. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004;16:3-9.
34. Patel AA, Lee-Lewis H, Hughes-Hanks J, Lewis CA, Anderson DM. Opposing roles for interferon regulatory factor-3 (IRF-3) and type I interferon signaling during plague. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002817.
35. Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol* 2004;7:25-32.
36. Krasznai M, Szaniszló K, Kraxner H, Vargha E, Kovacs M, Borocz Z, Kaszas E, et al. Association of TLR-4 and TNF-alpha polymorphisms with clinical symptoms and cytokine levels in patients with allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268:561-567.
37. Theodoropoulos GE, Saridakis V, Karantanos T, Michalopoulos NV, Zagouri F, Kontogianni P, Lymperi M, et al. Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development. *Breast* 2012;21:534-538.
38. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-191.
39. Kang DH, Weaver MT. Airway cytokine responses to acute and repeated stress in a murine model of allergic asthma. *Biol Psychol* 2010;84:66-73.
40. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikononopoulos J, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005;11:681-685.
41. Ragnarsdóttir B, Jonsson K, Urbano A, Gronberg-Hernandez J, Lutay N, Tammi M, Gustafsson M, et al. Toll-like receptor 4 promoter polymorphisms: common TLR4 variants may protect against severe urinary tract infection. *PLoS One* 2010;5:e10734.
42. Sharma BS, Jansen GB, Karrow NA, Kelton D, Jiang Z. Detection and characterization of amplified fragment length polymorphism markers for clinical mastitis in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci* 2006;89:3653-3663.
43. Nischalke HD, Berger C, Aldenhoff K, Thyssen L, Gentemann M, Grunhage F, Lammert F, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2011;55:1010-1016.

44. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:482-488.
45. Zeng HM, Pan KF, Zhang Y, Zhang L, Ma JL, Zhou T, Su HJ, et al. Genetic variants of toll-like receptor 2 and 5, helicobacter pylori infection, and risk of gastric cancer and its precursors in a chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:2594-2602.
46. Kathrani A, House A, Catchpole B, Murphy A, German A, Werling D, Allenspach K. Polymorphisms in the TLR4 and TLR5 gene are significantly associated with inflammatory bowel disease in German shepherd dogs. *PLoS One* 2010;5:e15740.
47. Wang D, Wang N, Zhang Y, Ma S, Geng Z, Zhou P, Zhou J, et al. Establishment of reproducible xenotransplantation model of T cell acute lymphoblastic leukemia in NOD/SCID mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2012;32:511-516.
48. Kim EJ, Chung WC, Lee KM, Paik CN, Kim SB, Oh YS, Lee YW, et al. Helicobacter pylori Infection Enhances Gastric Mucosal Inflammation in Individuals Carrying the 260-T Allele of the CD14 Gene. *Gut Liver* 2013;7:317-322.
49. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 2002;34:275-305.
50. Ibeagha-Awemu EM, Kgwatalala P, Ibeagha AE, Zhao X. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mamm Genome* 2008;19:226-245.
51. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 2014;5:514.
52. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:669-692.
53. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74-80.
54. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168:3536-3542.
55. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010;33:375-386.
56. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011;118:e16-31.

57. Zamora C, Canto E, Nieto JC, Angels Ortiz M, Juarez C, Vidal S. Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals. *Cytokine* 2012;60:257-265.
58. Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol* 2012;3:56.
59. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-995.
60. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008;180:5771-5777.
61. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* 2007;82:244-252.
62. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:621-634.
63. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2000;67:97-103.
64. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010;327:656-661.
65. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:533-544.
66. Tushinski RJ, Oliver IT, Guilbert LJ, Tynan PW, Warner JR, Stanley ER. Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell* 1982;28:71-81.
67. Gasson JC. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991;77:1131-1145.
68. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 2004;76:509-513.
69. Jenkins SJ, Hume DA. Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. *Trends Immunol* 2014;35:358-367.
70. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 2013;38:79-91.
71. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 2014;41:21-35.
72. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 2014;157:832-844.

73. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* 2012;13:1118-1128.
74. N AG, Guillen JA, Gallardo G, Diaz M, de la Rosa JV, Hernandez IH, Casanova-Acebes M, et al. The nuclear receptor LXRalpha controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat Immunol* 2013;14:831-839.
75. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013;229:176-185.
76. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 2011;11:750-761.
77. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-737.
78. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-969.
79. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;10:427-439.
80. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 2006;79:285-293.
81. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677-686.
82. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015;2015:816460.
83. Gautier EL, Chow A, Spanbroek R, Marcelin G, Greter M, Jakubzick C, Bogunovic M, et al. Systemic analysis of PPARgamma in mouse macrophage populations reveals marked diversity in expression with critical roles in resolution of inflammation and airway immunity. *J Immunol* 2012;189:2614-2624.
84. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953-964.
85. Ling GS, Bennett J, Woollard KJ, Szajna M, Fossati-Jimack L, Taylor PR, Scott D, et al. Integrin CD11b positively regulates TLR4-induced signalling pathways in dendritic cells but not in macrophages. *Nat Commun* 2014;5:3039.

86. Muller U, Stenzel W, Kohler G, Werner C, Polte T, Hansen G, Schutze N, et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 2007;179:5367-5377.
87. Guillemins M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* 2014;14:94-108.
88. Sipeki N, Antal-Szalmas P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014;20:2564-2577.
89. Fagan KJ, Rogers GB, Melino M, Arthur DM, Costello ME, Morrison M, Powell EE, et al. Ascites bacterial burden and immune cell profile are associated with poor clinical outcomes in the absence of overt infection. *PLoS One* 2015;10:e0120642.
90. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;33:657-670.
91. Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res* 2006;34:229-242.
92. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005;22:285-294.
93. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013;13:159-175.
94. Stadlbauer V, Mookerjee RP, Wright GA, Davies NA, Jurgens G, Hallstrom S, Jalan R. Role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in mediating neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G15-22.
95. Hager M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med* 2010;268:25-34.
96. Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta* 2002;1591:29-35.
97. Borregaard N, Christensen L, Bejerrum OW, Birgens HS, Clemmensen I. Identification of a highly mobilizable subset of human neutrophil intracellular vesicles that contains tetranectin and latent alkaline phosphatase. *J Clin Invest* 1990;85:408-416.
98. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 2009;30:513-521.
99. Bemelmans MH, Greve JW, Gouma DJ, Buurman WA. Increased concentrations of tumour necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in biliary obstruction in mice; soluble TNF receptors as prognostic factors for mortality. *Gut* 1996;38:447-453.

100. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997;385:729-733.
101. Bradley JR, Pober JS. Prolonged cytokine exposure causes a dynamic redistribution of endothelial cell adhesion molecules to intercellular junctions. *Lab Invest* 1996;75:463-472.
102. Messadi DV, Pober JS, Fiers W, Gimbrone MA, Jr., Murphy GF. Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. *J Immunol* 1987;139:1557-1562.
103. Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 1986;137:1893-1896.
104. Munro JM, Pober JS, Cotran RS. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am J Pathol* 1989;135:121-133.
105. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, Tischendorf JJ, et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One* 2010;5:e11049.
106. Albillos A, Hera Ad Ade L, Reyes E, Monserrat J, Munoz L, Nieto M, Prieto A, et al. Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;40:624-631.
107. Taylor CT, Dzus AL, Colgan SP. Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia: role for polarized release of tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology* 1998;114:657-668.
108. Frances R, Chiva M, Sanchez E, Gonzalez-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, et al. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007;46:797-803.
109. Cunningham KE, Turner JR. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1258:34-42.
110. Suliman MA, Khalil FM, Alkindi SS, Pathare AV, Almadhani AA, Soliman NA. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2012;3:92-98.
111. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
112. Grau GE, Fajardo LF, Piguet PF, Allet B, Lambert PH, Vassalli P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987;237:1210-1212.

113. Hunter CA. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *J Immunol* 1997;159:4127.
114. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-2095.
115. Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol* 2000;30:1683-1690.
116. Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, Barvais L, Huynh CH, Deviere J, DeSmet JM, et al. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *Am Heart J* 1997;133:335-339.
117. Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998;28:1597-1606.
118. Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1993;104:1492-1497.
119. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6:315-325.
120. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2502-2512.
121. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7251-7255.
122. Abbas AK, Janeway CA, Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* 2000;100:129-138.
123. Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, Nakajima K, et al. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 1998;18:4109-4117.
124. Ernst M, Inglese M, Waring P, Campbell IK, Bao S, Clay FJ, Alexander WS, et al. Defective gp130-mediated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling results in degenerative joint disease, gastrointestinal ulceration, and failure of uterine implantation. *J Exp Med* 2001;194:189-203.
125. Lemmers A, Gustot T, Durnez A, Evrard S, Moreno C, Quertinmont E, Vercruyse V, et al. An inhibitor of interleukin-6 trans-signalling, sgp130, contributes to impaired acute phase response in human chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 2009;156:518-527.

126. Le Moine O, Marchant A, Goldman M, Dupont E, Deviere J. Cytokines in alcoholic liver cirrhosis. *Acta Gastroenterol Belg* 1994;57:245-254.
127. Mackenzie I, Woodhouse J. C-reactive protein concentrations during bacteraemia: A comparison between patients with and without liver dysfunction. *Intensive Care Med* 2006;32:1344-1351.
128. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem* 2011;286:31263-31271.
129. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838-851.
130. Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, Washington MK, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet* 2013;381:468-475.
131. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014;383:1749-1761.
132. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-231.
133. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478-491.
134. Runyon BA, Committee APG. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *Hepatology* 2009;49:2087-2107.
135. Planas R, Montoliu S, Balleste B, Rivera M, Miquel M, Masnou H, Galeras JA, et al. Natural history of patients hospitalized for management of cirrhotic ascites. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1385-1394.
136. Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, Angeli P, et al. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology* 2003;38:258-266.
137. Castellote J, Lopez C, Gornals J, Tremosa G, Farina ER, Baliellas C, Domingo A, et al. Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagent strips. *Hepatology* 2003;37:893-896.
138. Fernandez J, Navasa M, Planas R, Montoliu S, Monfort D, Soriano G, Vila C, et al. Primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis delays hepatorenal syndrome and improves survival in cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;133:818-824.
139. Wong F, Bernardi M, Balk R, Christman B, Moreau R, Garcia-Tsao G, Patch D, et al. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut* 2005;54:718-725.
140. Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol* 2000;32:142-153.

141. Gines P, Fernandez-Esparrach G, Arroyo V, Rodes J. Pathogenesis of ascites in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997;17:175-189.
142. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:S35-50.
143. Garcia-Tsao G. Bacterial infections in cirrhosis: treatment and prophylaxis. *J Hepatol* 2005;42 Suppl:S85-92.
144. Mowat C, Stanley AJ. Review article: spontaneous bacterial peritonitis--diagnosis, treatment and prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1851-1859.
145. de Franchis R, Baveno VIF. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol* 2015;63:743-752.
146. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, Burroughs AK. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139:1246-1256, 1256 e1241-1245.
147. D'Amico G, De Franchis R, Cooperative Study G. Upper digestive bleeding in cirrhosis. Post-therapeutic outcome and prognostic indicators. *Hepatology* 2003;38:599-612.
148. Riordan SM, Williams R. The intestinal flora and bacterial infection in cirrhosis. *J Hepatol* 2006;45:744-757.
149. Gines P, Arroyo V. Paracentesis in the management of cirrhotic ascites. *J Hepatol* 1993;17 Suppl 2:S14-18.
150. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;34:32-37.
151. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Cabre E, Jimenez M, Urban A, Ojanguren I, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 1994;35:1648-1652.
152. Llovet JM, Bartoli R, March F, Planas R, Vinado B, Cabre E, Arnal J, et al. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998;28:307-313.
153. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Vinado B, Perez J, Cabre E, Arnal J, et al. Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology* 1996;23:781-787.
154. Lai D, Gorbach SL, Levitan R. Intestinal microflora in patients with alcoholic cirrhosis: urea-splitting bacteria and neomycin resistance. *Gastroenterology* 1972;62:275-279.

155. Novella M, Sola R, Soriano G, Andreu M, Gana J, Ortiz J, Coll S, et al. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin. *Hepatology* 1997;25:532-536.
156. Martin L, Sanchez E, Casafont F, Aguero J, Ledesma P, Nevado N, Pons Romero F. [Development of spontaneous bacterial peritonitis in an experimental model in cirrhotic rats. Relationship with intestinal bacterial translocation]. *Rev Esp Enferm Dig* 1995;87:632-636.
157. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis* 1988;157:1032-1038.
158. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014;60:197-209.
159. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:631-659.
160. Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, Spiliopoulou I, et al. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur J Clin Invest* 2012;42:439-446.
161. Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CE, Roos L, Slavik T, Stivaktas PI, Nieuwoudt M, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol* 2013;58:1125-1132.
162. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Hollwarth ME. The effect of vitamin C and vitamin E supplementation on bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common-bile-duct-ligated rats. *Eur Surg Res* 1997;29:187-194.
163. Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 2014;61:1385-1396.
164. Debure A, Colombel JF, Cywiner Golenzer C, Rouchette J, Hoang C, Dellagi K, Galian A, et al. [Role of the digestive tract immune system in the control of bacterial translocation in gnotoxenic mice]. *Gastroenterol Clin Biol* 1986;10:712-717.
165. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2:361-367.
166. Bolognesi M, Merkel C, Bianco S, Angeli P, Sacerdoti D, Amodio P, Gatta A. Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994;19:628-634.
167. Akalin HE, Laleli Y, Telatar H. Bactericidal and opsonic activity of ascitic fluid from cirrhotic and noncirrhotic patients. *J Infect Dis* 1983;147:1011-1017.

168. Lebrun L, Pelletier G, Briantais MJ, Galanaud P, Etienne JP. Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol* 1992;16:98-101.
169. Ramachandran A, Balasubramanian KA. Intestinal dysfunction in liver cirrhosis: Its role in spontaneous bacterial peritonitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:607-612.
170. Rodriguez-Ramos C, Galan F, Diaz F, Elvira J, Martin-Herrera L, Giron-Gonzalez JA. Expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci* 2001;46:1668-1676.
171. Arroyo V, Navasa M, Rimola A. Spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis: treatment and prophylaxis. *Infection* 1994;22 Suppl 3:S167-175.
172. Guarner C, Soriano G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Semin Liver Dis* 1997;17:203-217.
173. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355-1359.
174. Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4939-4942.
175. Such J, Guarner C, Soriano G, Teixido M, Barrios J, Tena F, Mendez C, et al. Selective intestinal decontamination increases serum and ascitic fluid C3 levels in cirrhosis. *Hepatology* 1990;12:1175-1178.
176. Roberts TL, Dunn JA, Terry TD, Jennings MP, Hume DA, Sweet MJ, Stacey KJ. Differences in macrophage activation by bacterial DNA and CpG-containing oligonucleotides. *J Immunol* 2005;175:3569-3576.
177. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013;14:996-1006.
178. Simon-Talero M, Garcia-Martinez R, Torrens M, Augustin S, Gomez S, Pereira G, Guevara M, et al. Effects of intravenous albumin in patients with cirrhosis and episodic hepatic encephalopathy: a randomized double-blind study. *J Hepatol* 2013;59:1184-1192.
179. Jonkers D, Stockbrugger R. Review article: Probiotics in gastrointestinal and liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26 Suppl 2:133-148.
180. Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol* 1995;24:343-362.
181. Aguirre M, Collins MD. Development of a polymerase chain reaction test for specific identification of the urinary tract pathogen *Aerococcus urinae*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1350-1353.
182. Kumar H, Salminen S, Verhagen H, Rowland I, Heimbach J, Banares S, Young T, et al. Novel probiotics and prebiotics: road to the market. *Curr Opin Biotechnol* 2015;32:99-103.

183. Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, et al. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999;76:279-292.
184. Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T, Koga Y. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol* 2003;47:371-378.
185. Plevy S. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:77-92.
186. Ichikawa H, Kuroiwa T, Inagaki A, Shineha R, Nishihira T, Satomi S, Sakata T. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. *Dig Dis Sci* 1999;44:2119-2123.
187. Urao M, Fujimoto T, Lane GJ, Seo G, Miyano T. Does probiotics administration decrease serum endotoxin levels in infants? *J Pediatr Surg* 1999;34:273-276.
188. D'Argenio G, Mazzacca G. Short-chain fatty acid in the human colon. Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999;472:149-158.
189. Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S, Yasuda K. Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol* 2006;143:103-109.
190. Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 2005;147:186-191.
191. Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, et al. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 2000;18:2613-2623.
192. Borruel N, Carol M, Casellas F, Antolin M, de Lara F, Espin E, Naval J, et al. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 2002;51:659-664.
193. Rangavajhyala N, Shahani KM, Sridevi G, Srikumaran S. Nonlipopolysaccharide component(s) of *Lactobacillus acidophilus* stimulate(s) the production of interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha by murine macrophages. *Nutr Cancer* 1997;28:130-134.
194. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:179-185.
195. Kirjavainen PV, ElNezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF. Effects of orally administered viable *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS on mouse lymphocyte proliferation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:799-802.

196. Marteau P. Clinical and pathological aspects of inflammatory bowel disease. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* 1999;2:83-92.
197. Deshpande G, Rao S, Patole S. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2007;369:1614-1620.
198. Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, Del Vecchio Blanco C. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:540-543.
199. Tandon P, Moncrief K, Madsen K, Arrieta MC, Owen RJ, Bain VG, Wong WW, et al. Effects of probiotic therapy on portal pressure in patients with cirrhosis: a pilot study. *Liver Int* 2009;29:1110-1115.
200. Albillos A, de-la-Hera A, Alvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet* 2004;363:1608-1610.
201. Starkel P, De Saeger C, Delire B, Magat J, Jordan B, Konda VR, Tripp ML, et al. Tetrahydro Iso-Alpha Acids and Hexahydro Iso-Alpha Acids from Hops Inhibit Proliferation of Human Hepatocarcinoma Cell Lines and Reduce Diethylnitrosamine Induced Liver Tumor Formation in Rats. *Nutr Cancer* 2015;67:748-760.
202. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2007;25:185-209.
203. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Baldassarre M, Lucchetti G, Quarta C, Patti C, et al. A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *J Hepatol* 2009;51:991-999.
204. Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Suarez-Cuenca JA, Trejo-Solis C, Lopez V, Sanchez-Sevilla L, Yanez L, et al. Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 2001;34:677-687.
205. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982;83:1183-1190.
206. Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Iwakiri Y, Groszmann RJ. A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2003;39:940-946.
207. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994;21:792-796.

208. Guarner C, Runyon BA, Heck M, Young S, Sheikh MY. Effect of long-term trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on ascites formation, bacterial translocation, spontaneous bacterial peritonitis, and survival in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci* 1999;44:1957-1962.
209. Ubeda M, Munoz L, Borrero MJ, Diaz D, Frances R, Monserrat J, Lario M, et al. Critical role of the liver in the induction of systemic inflammation in rats with preascitic cirrhosis. *Hepatology* 2010;52:2086-2095.